

Fremstilling og faktoriell undersøkelse av stabile pektindekkede liposomer for lokalbehandling av munnhulen

Masteroppgave i galensk farmasi

Siv Jorunn Alund



Avdeling for farmasi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2009

Forord

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden mars 2008 til mai 2009.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder, professor Gro Smistad, for god veiledning og inspirasjon under arbeidet, samt prioritering og engasjement for oppgaven.

Jeg vil også rette en stor takk til min veileder, førsteamanuensis Marianne Hiorth, for gode ideer og innspill, samt engasjert veiledning.

Takk til min veileder, cand. pharm Sanko Nguyen, for godt samarbeid og praktisk hjelp, og til professor Sverre Arne Sande for veiledning ved statistiske analyser.

Jeg vil rette en spesielt stor takk til avdelingsingeniør Tove Larsen for uvurderelig hjelp med alle aspekter av det praktiske laboratoriearbeidet. Takk også til andelingsingeniør Helge Gundersen for hjelp og praktisk veiledning.

En stor takk til de andre masterstudentene ved avdeling for galenisk farmasi: Åse, Mehrin, Reidun og Linda. Takk for godt samarbeid, støtte gjennom året og mange hyggelige stunder.

Til slutt vil jeg takke min mann, Are, for uvurderelig hjelp ved dataproblemer og språklige innspill, samt god støtte og tålmodighet under hele farmasistudiet. Takk for at du alltid stiller opp for meg!

Blindern, mai 2009

Siv Jorunn Alund

Sammendrag

Mukoadhesive formuleringer kan forbedre behandlingen av lokale sykdomstilstander i munnhulen, ved å forlenge terapeutisk konsentrasjon. Liposomer har flere fordeler framfor adhesive tabletter og plastre, som for eksempel at de ikke forstyrrer munnhulens normalfunksjoner og at de spres jevnere i munnhulen. Liposomer kan gjøres mukoadhesive ved å dekke dem med polymerer. Pektin er en egnet mukoadhesiv polymer, fordi den ikke brytes ned av enzymene i spyttet, er negativt ladet og regnes som trygg ved bruk. Det finnes tre typer pektin med forskjellige egenskaper: Lavmetoksyliert (LM), høymetoksyliert (HM) og amidert pektin.

I denne studien ble positive og negative liposomer forsøkt dekket med LM-, HM- og amidert pektin. Partikkelstørrelser og zetapotensiale ble sammenliknet med udekkede liposomer, samt med pektinløsningene som ble benyttet til dekkingen. For de positive liposomene ble adsorpsjon av pektin til liposomene bekreftet ved at partikkelstørrelsene økte moderat og at zetapotensialet skiftet fra positivt til negativt. Resultatet kunne ikke forklares med pektinløsningenes egenskaper alene og var tilstede også når overskuddet av pektin ble vasket vekk. Det kunne ikke påvises at de negative liposomene ble dekket av pektin. Partikkelstørrelse og zetapotensiale for de dekkede liposomene var avhengig av anvendt pektintype. HM-pektin ga pektindekkede liposomer med størst partikkelstørrelse og minst negativt zetapotensiale. LM-pektin ga pektindekkede liposomer med lavest partikkelstørrelse og mest negativt zetapotensiale.

Det ble benyttet statistisk forsøksplanlegging for å undersøke hvilke prosess- og formuleringsfaktorer som hadde betydning for produktets egenskaper. Undersøkelsen ble gjort ved hjelp av to screeningdesign og et optimaliseringsdesign. Faktorer som ble undersøkt var fasetilstand av lipidene, tilsetningsrekkefølge og hastighet ved produksjon, pektinkonsentrasjon, lipidkonsentrasjon og mengde ladet lipid. Det viste seg at en økning i lipid- og pektinkonsentrasjon økte partikkelstørrelsene, og at partikkelstørrelsene ble lavest dersom liposomene ble dryppet til pektinløsningene.

Effektene på partikkelstørrelsene skyldtes trolig en endring i konformasjonen for det adsorberte pektinet, eller påvirkning på mengde adsorbert pektin. De viktigste faktorene for zetapotensialet til de pektindekkede liposomene var pektinkonsentrasjonen og mengde ladet lipid, som begge gjorde zetapotensialet mer negativt. Effekten skyldtes trolig påvirkning på mengde adsorbert pektin.

Stabiliteten til positive liposomer dekket med de tre ulike pektintypene ble observert over en periode på 12 uker. Studien viste at de pektindekkede liposomene var mer stabile enn udekkede liposomer. Stabiliteten var avhengig av hvilken pektintype som var blitt benyttet til dekkingen. Produksjon av stabile pektindekkede liposomer forutsatte imidlertid at pektinkonsentrasjonen og mengde ladet lipid var tilstrekkelig høye i forhold til lipidkonsentrasjonen, slik at liposomene ble fullstendig dekket.

Innhold

FORORD	3
SAMMENDRAG.....	5
INNHold.....	7
1. INNLEDNING.....	11
1.1 BAKGRUNN.....	11
1.2 HENSIKT MED OPPGAVEN.....	12
1.3 FORKORTELSER	13
2. TEORI	15
2.1 MUNNHULEN SOM MÅL FOR LOKALBEHANDLING	15
2.2 LIPOSOMER.....	19
2.3 PEKTIN	25
2.4 KARAKTERISERING	30
2.5 STATISTISK FORSØKSPLANLEGGING, FAKTORIELLE DESIGN OG MULTIVARIAT DATAANALYSE	36
3. MATERIALER OG INSTRUMENTER.....	43
3.1 MATERIALER	43
3.2 LØSNINGER.....	44
3.3 INSTRUMENTER	45
3.3.1 Opprensning og karakterisering av pektin	45
3.3.2 Produksjon av pektindekkede liposomer	45
3.3.3 Måling av partikkelstørrelse og zetapotensiale.....	46
3.3.4 Diverse utstyr	46

4. METODER.....	47
4.1 OPPRENSING AV PEKTIN	47
4.2 FREMSTILLING AV LIPOSOMER	47
4.3 FREMSTILLING AV PEKTINLØSINGER.....	48
4.4 DEKKING AV LIPOSOMER MED PEKTIN.....	48
4.5 VASKING AV PEKTINDEKKEDE LIPOSOMER (ULTRASENTRIFUGERING).....	49
4.6 MÅLING AV PARTIKKELSTØRRELSE (PCS)	50
4.7 MÅLING AV ZETAPOTENSIALE	50
4.8 MÅLING AV pH	51
4.9 MÅLING AV TURBIDITET.....	51
4.10 KARAKTERISERING AV PEKTIN	52
4.10.1 Bestemmelse av molekylvekt	52
4.10.2 Bestemmelse av hugginskonstanten i 5 mM fosfatbuffer pH 7.....	53
4.11 MULTIVARIAT DATAANALYSE.....	53
5. FORSØKSOPPSETT	54
5.1 DEL 1: VERIFISERING AV DEKKINGEN OG REPRODUSERBARHET AV METODEN	55
5.1.1 Innledende forsøk	55
5.1.2 Verifisering av dekkingen	55
5.1.3 Reproduserbarhet av dekkingen	57
5.2 DEL 2: UNDERSØKELSE AV UTVALGTE PROSESS- OG FORMULERINGSFAKTORERS BETYDNING FOR PRODUKTETS EGENSKAPER.....	58
5.2.1 Fasetilstand for lipidene, pektinkonsentrasjon og tilsetningsrekkefølge; 2 ³ -design....	58
5.2.2 Lipidkonsentrasjon, mengde ladet lipid, tilsetningshastighet og pektinkonsentrasjon; 2 ⁴⁻¹ - design	60
5.2.3 Optimalisering av formuleringen; central composite design.	62

5.2.4	<i>Faktorforsøkernes relevans for dekking av liposomer med amidert pektin og HM pektin</i>	67
5.3	DEL 3: STABILITETSSTUDIE AV PEKTINDEKKEDE LIPOSOMER	68
6.	RESULTATER	71
6.1	KARAKTERISERING AV PEKTIN	71
6.1.1	<i>Bestemmelse av molekylvekt</i>	71
6.1.2	<i>Bestemmelse av hugginskonstanten i 5 mM fosfatbuffer pH 7</i>	72
6.2	DEL 1: VERIFISERING AV DEKKINGEN OG REPRODUSERBARHET AV METODEN	73
6.2.1	<i>Innledende forsøk</i>	73
6.2.2	<i>Verifisering av dekkingen</i>	74
6.2.3	<i>Reproduserbarhet av dekkingen ved høy og lav tilsetningshastighet</i>	80
6.3	DEL 2: UNDERSØKELSE AV UTVALGTE PROSESS- OG FORMULERINGSFAKTORERS BETYDNING FOR PRODUKTETS EGENSKAPER	82
6.3.1	<i>Fasetilstand for lipidene, pektinkonsentrasjon og tilsetningsrekkefølge; 2³-design</i>	82
6.3.2	<i>Lipidkonsentrasjon, mengde ladet lipid, tilsetningshastighet og pektinkonsentrasjon; 2⁴⁻¹-design</i>	84
6.3.3	<i>Optimalisering av formuleringen; central composite design</i>	88
6.3.4	<i>Faktorforsøkernes relevans for HM-pektin og amidert petkin</i>	94
6.4	DEL 3: STABILITETSSTUDIE AV PEKTINDEKKEDE LIPOSOMER	95
7.	DISKUSJON	101
7.1	KARAKTERISERING AV PEKTIN	101
7.2	DEL 1: VERIFISERING AV DEKKINGEN OG REPRODUSERBARHET AV METODEN	104
7.3	DEL 2: UNDERSØKELSE AV UTVALGTE PROSESS OG FORMULERINGSFAKTORERS BETYDNING FOR PRODUKTETS EGENSKAPER	116
7.4	DEL 3: STABILITETSSTUDIE AV PEKTINDEKKEDE LIPOSOMER	143
8.	KONKLUSJON	151

9. KILDELISTE	153
10. VEDLEGG.....	161
VEDLEGG 1: VERIFISERING AV DEKKINGEN.....	162
VEDLEGG 2: FULLFAKTORFORSØK, 2^3 -DESIGN	164
VEDLEGG 3: REDUSERT FAKTORFORSØK, 2^{4-1} -DESIGN.....	166
VEDLEGG 4: OPTIMALISERING, CENTRAL COMPOSITE DESIGN	169
VEDLEGG 5: STABILITETSSTUDIE	173

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Konvensjonelle formuleringer for lokalbehandling av sykdomstilstander i munnhulen kan gi høye nivåer av legemiddel lokalt, men kun for en kort tid (Harris, D. og Robinson, J. R. 1992). Effektiv behandling krever imidlertid en doseringsform som retarderes på administrasjonsstedet, modulerer frisettingen av legemidlet, beskytter legemidlet mot nedbryting og er biokompatibel. En slik doseringsform må sannsynligvis være et multikomponentsystem (Yang, X. og Robinson, J. R. 1998).

De mest studerte retarderbare formuleringene til munnhulen er adhesive plastre og tabletter (Hoogstraate, J. et al. 2001). En ulempe med disse er begrenset brukervennlighet, fordi formuleringene forstyrrer munnhulens normalfunksjoner (Sudhakar, Y. et al. 2006). Videre kan de gi ujevn frisetting av virkestoff i munnhulen (Smart, J. D. 2004).

En mulig løsning på disse utfordringene kan være kolloidale systemer. Slike systemer er flytende og påvirker normalfunksjoner i liten grad, samtidig som de spres jevnt i munnhulen (Smart, J. D. 2004).

Liposomer er et mye undersøkt kolloidalt systemet for legemiddeladministrasjon. De er biokompatible, non-toksiske, trigger ikke immunreaksjoner og kan modulere frisettingen av et legemiddel (Lasic, D. D. 1993, s. 263-264). Liposomer har vært forsøkt brukt i munnhulen, da særlig mot ulcerøse tilstander (Harsanyi, B. B. et al. 1986; Farshi, F. S. et al. 1996; Erjavec, V. et al. 2006).

Dersom liposomer med retensjonsegenskaper benyttes, vil disse sannsynligvis være ytterligere egnet for lokalbehandling av munnhulen. Dekking av liposomene med polymerer er en anvendt strategi for å oppnå adhesivitet (Takeuchi, H. et al. 1994; Takeuchi, H. et al. 2003; Jain, A. K. et al. 2007; Thirawong, N. et al. 2008). I tillegg

vil polymerdekking av liposomene kunne stabilisere dem mot degradering og redusere frisettingshastigheten av legemiddelet (Alamelu, S. og Rao, K. P. 1991).

Pektin er en adhesiv polymer som hittil er lite undersøkt for dekking av liposomer. Den er spesielt godt egnet fordi den er biodegraderbar, biokompatibel og non-toksisk, samtidig som den ikke brytes ned av enzymer i munnhulen (Thakur, B. R. et al. 1997). Ladningen polymeren har ved fysiologisk pH gir mulighet for elektrostatisk adsorpsjon til positivt ladde liposomer (Sriamornsak, P. et al. 2007).

1.2 Hensikt med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven var å gjøre en grundig undersøkelse av konseptet pektindekkede liposomer.

Første delmål var å fremstille komplekser bestående av enkeltliposomer dekket med et lag pektin. Det skulle videre undersøkes om fremstillingsmetoden var reproducerbar med hensyn på produktets egenskaper, herunder zetapotensiale og partikkelstørrelse. Disse to egenskapene kan være av betydning for produktets stabilitet og adhesjon til slimhinner.

Andre delmål var å avdekke og undersøke prosess- og formuleringsfaktorerers betydning for produktet, basert på forsøk med lavmetoksyliert pektin. Det skulle utvikles modeller som kunne beskrive faktorenes effekt på zetapotensialet og partikkelstørrelsen.

Det siste målet var å undersøke stabiliteten til pektindekkede liposomer av ulik sammensetning. Stabiliteten skulle sammenliknes med udekkede liposomer.

1.3 Forkortelser

Lipider

DPPC	Dipalmitoyl phosphatidyl choline
Egg- PC	Egg-phosphatidyl cholin
DPTAP	1,2-Dipalmitoyl-3-Trimethylammonium propan
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium propan
DPPG	Dipalmitoyl phosphatidyl glyserol

Pektintyper

HM-pektin	Høymetoksyliert pektin
LM-pektin	Lavmetoksyliert pektin

Statistikk

PC	Principal component
PLS	Partial least square regression
PCA	Principal component analysis
MLR	Multiple linear regression
RMSEC	Root mean square error of calibration
RMSEP	Root mean square error of prediction

Karakterisering

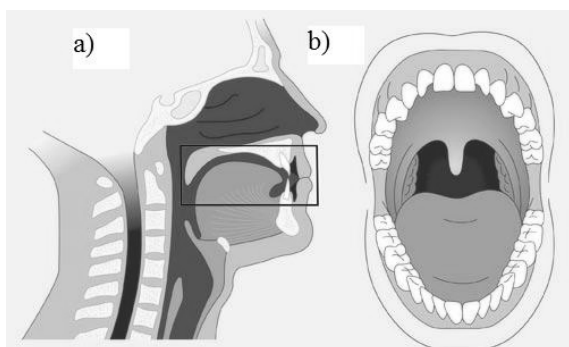
PSC	Photon correlation spectroscopy
PI	Polydispersity index

2. Teori

2.1 Munnhulen som mål for lokalbehandling

2.1.1 Generell bakgrunn

Munnhulen er åpningen til mage-tarmkanalen og strekker seg fra leppene og kinnene utvendig til halsåpningen i det indre, slik Figur 2-1 viser. Munnhulens hovedfunksjoner er inntak av mat, tygging og svelging (Berkovitz, B. K. B. et al. 2002, s. 1-7). Mulighet for lokalbehandling av munnhulen vil være påvirket av disse funksjonene.



Figur 2-1: a) Munnhulen som åpning til mage-tarm kanalen og b) enkel innvendig illustrasjon av munnhulen (Tidsskriftet 2006).

Lokalbehandling i munnhulen brukes ved blant annet tannkjøttbetennelse, orale infeksjoner og sår, caries i tenner og munntørrehet (Smart, J. D. 2004; Felleskatalogen 2008). Formuleringene som benyttes på det norske markedet er munnskyllevæsker/gurglevann, tyggegummi, sugetabletter, tannlakk, dentalgel, munnsalver og dentalinnlegg (Felleskatalogen 2008).

2.1.2 Munnhulens fysiologi og anatomi

Det er vanlig å dele munnhulen inn i området utenfor tennene, *vestibulen*, og området innenfor tennene, *cavum oris proprium*. Tennene er festet i alveolebeinet, som er en

del av kjevebeinet (Berkovitz, B. K. B. et al. 2002, s. 1-7). Som resten av mage-tarm kanalen, er innsiden av munnhulen kledd med mukusmembraner. Mukusmembranene består av epitelvev dekket av et slimlag, mukus, som holder dem fuktige (Smart, J. D. 2005).

Alveolebenet er dekket av tannkjøttet, *gingvia*, som er en mukusmembran. I underkjeven går *gingvia* over i det *sublinguale* området, som består av den bevegelige mukusmembranen under tungen. I overkjeven går *gingvia* over i den harde ganen, som består av mukusmembran tett bundet til benet i munnhulens tak. Den harde ganen går i bakre del over i den myke ganen, som er bevegelig fordi mukusmembranen hviler på fibrøst materiale og ikke benvev. Det mukusmembrankledde området på innsiden av kinnene kalles det *bukkale* området. Dette strekker seg fra munnvikene og bak til mandlene (Berkovitz, B. K. B. et al. 2002, s. 1-7).

Oralmukosa er bygget opp av flere lag epitelceller, basementmembran, lamina propria og sub mucosa (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994; Smart, J. D. 2004). I den harde gane og *gingvia* er epitelcellene keratiniserte, mens i det *bukkale* og det *sublinguale* området er cellene ikke-keratiniserte (Smart, J. D. 2004). Keratiniserte celler har mistet alle organeller, inkludert cellekjerne, og er fullstendig fylt med proteinmaterialet keratin (Berkovitz, B. K. B. et al. 2002, s. 220-249). Tykkelsen av oral mukosa varierer mellom de ulike områdene av munnhulen. Bukkal mukosa har en tykkelse på 500-800 µm, mens mukosa i det *sublinguale* området, *gingvia* og på undersiden av tungen er ca 100-200 µm tykt (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994).

2.1.3 Fysiologiske utfordringer ved lokalbehandling av munnhulen

For å få effekt av medikamentell behandling, er det ved mange sykdomstilstander ideelt at terapeutisk konsentrasjon på virkestedet oppnås umiddelbart og forblir konstant over den ønskede varigheten av behandlingen (Hillery, A. M. 2001). I munnhulen er det identifisert flere utfordringer i forhold til å beholde konstant legemiddelkonsentrasjon gjennom hele behandlingstiden. De viktigste er fortykning av legemiddel i saliva, spyttet, med påfølgende ufrivillig svelging (Rathbone, M. J. et

al.; Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994; Smart, J. D. 2004; Sudhakar, Y. et al. 2006) og inntak av mat og drikke som interfererer med legemiddelformuleringen (Rathbone, M. J. et al.; Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994). Enzymatisk nedbrytning av legemidlet eller doseringsformen kan også være et problem i denne sammenheng (Yang, X. og Robinson, J. R. 1998).

Saliva

Saliva, spyttet, er væsken som beskytter alt vevet i munnhulen mot blant annet mikroorganismer, kjemiske stoff og mekanisk belastning. Saliva er derfor nødvendig for god munnhelse (Rathbone, M. J. et al. 1993). Ytterligere funksjoner er blant annet fukting av munnhulen ved snakking, tygging og svelging, oppløsning av mat, enzymatisk degradering av næringsstoffer og remineralisering av tannemaljen (Berkovitz, B. K. B. et al. 2002, s. 255-267).

Spyttet inneholder ca 99% vann og er en kompleks væske bestående av både organisk og uorganisk materiale (Rathbone, M. J. et al. 1993). Av uorganisk materiale har saliva høyt nivå av kalium, bikarbonat, kalsium, fosfor, klorid, tiocyanat og urea, mens natriumnivået er lavt (Sudhakar, Y. et al. 2006). Viktige organiske komponenter i saliva er glukoproteinet mucin, som er hovedbestanddelen av mukus, og immunoglobuliner (IgA) som bidrar i det mukosale immunsystemet (Berkovitz, B. K. B. et al. 2002, s. 255-267). Mucinet gjør at saliva danner mukusfilmen som dekker hele munnhulens overflate. pH i saliva er mellom 6,5 og 7,5 (Rathbone, M. J. et al. 1993).

Daglig salivavolum for voksne mennesker er normalt ca 1 L , med en hvileflow på 0,5 ml/minutt. Dette kan øke til 7 ml/minutt ved parasympatisk stimulering (Smart, J. D. 2004).

Enzymer i saliva

Enzymer som finnes i saliva er blant annet amylase, som bryter ned glukosidbindinger i karbohydrater, lysozym, som bryter ned bakterienes cellevegg, karboksylaser, som spalter esterbindinger og lipaser, som bryter ned fett (Sudhakar, Y. et al. 2006). Enzymene vil potensielt kunne bryte ned labile legemidler og doseringsformer som administreres til munnhulen. Liposomer kan være sensitive for lipaser og karboksylaser.

2.1.4 Mukoadhesive formuleringer til lokalbehandling av oral mukosa

Effektiv lokalbehandling krever en strategi som øker doseringsformens retensjonstid i munnhulen og beskytter den aktive substansen og doseringsformen mot eventuelle nedbrytende enzymer.

Mukoadhesive polymerer er polymerer som kan feste seg til mucinet i mukos og forbli der over lengre tid. Mucin består av oligosakkarider med negativ ladning ved fysiologisk pH, festet til en proteinryggrad (Yang, X. og Robinson, J. R. 1998). Glykoproteinet kan fungere som en kobling mellom doseringsformen og det underliggende epitelet (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994). Mukoadhesive polymerer kan på denne måten gi formuleringer økt retensjonstid på virkestedet og dermed bedre deres egnethet ved lokalbehandling (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994; Smart, J. D. 2004; Smart, J. D. 2005).

En viktig utfordring ved utvikling av mukoadhesiveformuleringer til oral mukosa er at fornyelseshastigheten, turn over, i oral mukosa er høy (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994). Denne oppgis i litteraturen til å ligge mellom 3 og 20 dager (Smart, J. D. 2004). Flere utfordringer er bevegeligheten av oral mukosa (Rathbone, M. J. et al. 1993) og smak og følelse av å ha et objekt i munnhulen over tid (Smart, J. D. 2004).

Mukoadhesive materialer

De mest studerte mukoadhesive materialene er hydrofile makromolekyler med funksjonelle grupper som kan danne hydrogenbindinger (Smart, J. D. 2005).

Eksempeltsvis kan dette være polyakrylsyre polymerer, cellulose derivater, alginater, kitosan og gelatin (Yang, X. og Robinson, J. R. 1998).

For at en polymer skal være mukoadhesiv, må molekylvekt være tilstrekkelig høy slik at kjedene kan penetrere mukusnettverket, men mindre molekylvekt er mulig dersom polymerens konformasjon er ekspandert (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994).

Kryssbinding innad i polymeren kan imidlertid redusere mukoadhesiviteten (Hagesaether, E. et al. 2008). Årsaken til dette er trolig at kjedenes fleksibilitet og mobilitet reduseres. Dermed reduseres også kjedenes evne til å diffundere inn i mukusnettverket (Hagesaether, E. et al. 2008). Anioniske polymerer er mindre toksiske enn kationiske og er derfor foretrukket. Andre faktorer som påvirker mukoadhesiviteten av polymerer er konsentrasjonen, pH i miljøet og grad av hydrering. For kraftig hydrering kan gi så høyt vanninnhold i polymeren at den blir glatt og slimete uten adhesjonsevne (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994).

Binding av polymer til mukus skjer både fysisk og ved hjelp av kjemiske bindinger. Fysisk binding skyldes at kjedene til den adhesive polymeren hefter seg fysisk i mucinmolekylet, mens kjemiske bindinger kan være kovalente eller nonkovalente interaksjoner mellom mucin og polymeren. Non-kovalente bindinger inkluderer hydrofobe bindinger, hydrogenbindinger og elektrostatiske bindinger (Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. 1994).

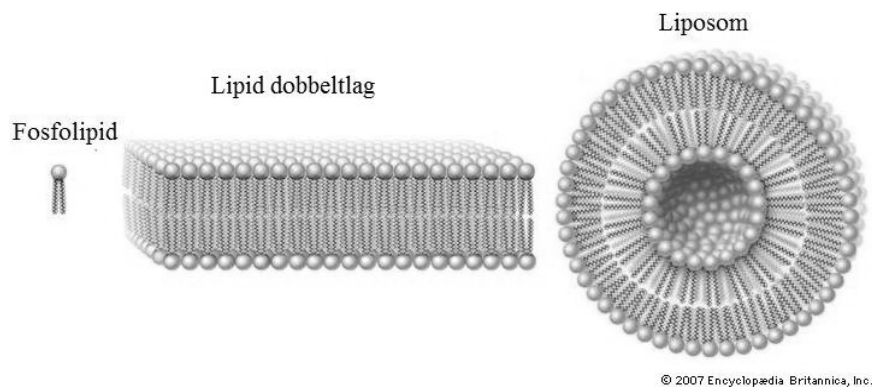
2.2 Liposomer

Liposomer har vært intensivt studert helt siden de ble oppdaget på 1960-tallet (Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. 1994). I følge Storm og Crommelin (1998) tok utviklingen av liposomer som legemiddelbærer hele 20 år. I dag er flere liposomale legemiddelformuleringer på markedet, som for eksempel langtidssirkulerende

liposomale formuleringer av det antifungale legemidlet amfotericin B (Ambisome®) og kjemoterapeutikumet doksorubicin (Caelyx® og Myocet®) (Felleskatalogen 2009).

2.2.1 Generell bakgrunn

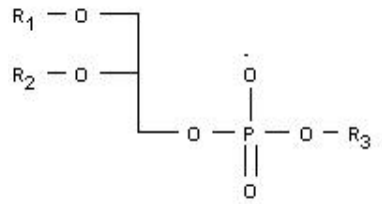
Liposomer er sfæriske, lukkede vesikler (Figur 2-2). Vesiklene er bygget opp av et eller flere krummede lipid dobbeltlag med et vandig indre miljø. Tykkelsen av hvert lipid dobbeltlag er ca 4 nm. Liposomenes størrelse kan variere fra 20 nm til flere mikrometer (Lasic, D. D. 1993, s. 3-7).



Figur 2-2: Fosfolipidene og lipid dobbeltlagene som bygger opp liposomer, samt liposomenes sfæriske, lukkede struktur (Encyclopedia britannica 2009).

Lipid dobbeltlagene består av amfifile lipidmolekyler som ordner seg med de hydrofobe gruppene pekende mot hverandre og de hydrofile hodegruppene pekende mot vannfasen, som Figur 2-2 viser (Lasic, D. D. 1993, s. 3-7). Fosfolipider er de mest brukte amfifile lipidene. De består av to fettsyrer estrifisert til glyserol (Tabell 2-1). Fettsyrene kan være av varierende lengde og grad av umettethet. Hodegruppen kan være positivt ladet, negativt ladet, zwitterioniske eller uladet med mange hydratiserbare hydroksylgrupper. Fosfatidylkolin (PC), fosfatidylglyserol (PG) og fosfatidyl serin (PS) er eksempler på tre vanlige fosfolipider i liposomer (Tabell 2-1). Navnet henviser til hodegruppens struktur (Lasic, D. D. 1993, s. 9-62).

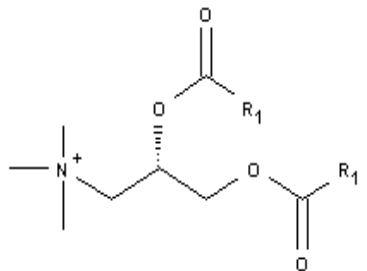
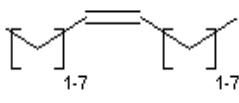

Tabell 2-1: Strukturformler for tre vanlige fosfolipider (Lasic, D. D. 1993, s. 9-62).

Fosfolipid generell struktur	-R ₃ (hodegruppe)	Navn	Forkortelse	Ladning
	-CH ₂ -CH ₂ -NMe ₃ ⁺	Fosfatidylkolin	PC	Zwitterionisk
	-CH ₂ -CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	Fosfatidylserin	PS	Negativ
	-CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH	Fosfatidyl glyserol	PG	Negativ
R ₁ og R ₂ =Fettsyrekjeder, mettet eller umettet				

Liposomer med positive lipider er sjeldnere, og de anvendes hovedsaklig for transfeksjon av gener. Transfeksjonen fungerer ved at positive liposomer danner komplekser med negativt DNA, som så tas opp av celler ved endocytose.

Tranfeksjonslipider består på samme måte som fosfolipider av to lineære hydrokarbonkjeder med den positive hodegruppen bundet til hydrokarbonkjedene ved hjelp av en bindende gruppe. Diacyltrimetyl ammonium propanene (Diacyl TAP-er, Tabell 2-2) er eksempel på en gruppe kationiske lipider brukt til transfeksjon (Karmali, P. P. og Chaudhuri, A. 2007).

Tabell 2-2: Strukturformler for diacyl-trimetylammmonium propanene (Diacyl TAP-er), som er en gruppe positive lipider (Karmali, P. P. og Chaudhuri, A. 2007).

TAP-grunnstruktur	-R1-gruppe	Navn	Forkortelse
		1,2-dioleoyl -3-triammonium propan	DOTAP
		1,2-dipalmitoyl-3-triammonium propan	DPTAP

Den fysiske tilstanden til liposomene er temperaturavhengig. Den viktigste faseovergangen er fra gelfase til flytende krystallform, hvor hydrokarbonkjeder med høy grad av ordnethet smelter til flytende krystaller. Temperaturen hvor dette skjer

kalles faseomvandlingstemperaturen, T_c , og er en viktig fysisk parameter for liposomer (Lasic, D. D. 1993, s. 54). I gelfase er liposomenes dobbeltlag mer rigide og mindre permeable enn i flytende krystallfase. Akkurat i T_c er imidlertid permeabiliteten spesielt høy. T_c er avhengig av fettsyrenes kjedelengde, grad av umettethet og type hodegruppe. For det naturlige fosfolipidet egg-phosphatidyl cholin (egg-PC), som har høy grad av umettethet og fettsyrer av varierende kjedelengde, er T_c ca -15°C . Egg-PC danner derfor flytende krystallfase liposomer ved romtemperatur (Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. 1994). For dipalmitoylphosphatidyl choline (DPPC), som er et mettet, halvsyntetisk fosfolipid, er T_c imidlertid $41,4^\circ\text{C}$. DPPC danner derfor gelfase liposomer ved romtemperatur (Lasic, D. D. 1993, s. 17). Ved innkorporering av diacyl TAP-er i liposomer, velges TAP-er som har R_1 -gruppe med samme grad av umettethet og kjedelengde som hovedlipidet. Dette for å hindre for stor innvirkning på T_c (Smistad, G. et al. 2007).

Liposomer kan brukes som legemiddelbærere. Interaksjonen mellom dobbeltmembranene og legemiddelet som bæres, er avhengig av egenskaper ved dobbeltmembranene, som rigiditet og ladning, og legemiddelets fysikalsk kjemiske egenskaper. Hydrofile vannløselige stoff vil fanges i den indre vannfasen til liposomene. For disse legemidlene vil dobbeltmembraner i gelfase eller med innhold av kolesterol utgjøre en permeabilitetsbarriere. Amfifile legemidler kan assosieres til liposomene ved å orientere seg i indre eller ytre del av dobbeltmembranen. Lipofile legemidler kan fordeles i dobbeltmembranens indre. Motsatt ladning mellom legemiddel og liposom kan føre til elektrostatiske binding av legemiddel til dobbeltmembranens utside eller innside (Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. 1994).

2.2.2 Stabilitet

Fosfolipidene kan utsettes for kjemisk nedbrytning i form av hydrolyse av esterbindingene eller oksidasjon av umettede fettsyrekjeder. Oksideringen kan begrenses ved å erstatte umettede lipider med mettede. Hvis bruk av umettede lipider er ønskelig, kan antioksidanter og radikal scavengers tilsettes, eller liposomene kan

oppbevares mørkt, kaldt og oksygenfritt. Hydrolyse kan begrenses ved å velge optimal pH (ca 6,5) og lav bufferkonsentrasjon. Kald oppbevaring og frysetørking, dersom det lar seg gjøre, beskytter også liposomene mot hydrolyse (Lasic, D. D. 1993; Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. 1994; Zuidam, N. J. et al. 2003).

Fysiske prosesser som påvirker shelf-life til liposomer er aggregering/flokkulering, fusjonering og for rask lekkasje av legemiddelet. Aggregering/flokkulering innebærer at liposomene danner større aggregater bygget opp av individuelle liposomer. Dette er en reversibel prosess. Ved fusjonering fusjonerer enkeltliposomene til nye kolloide strukturer. Fusjoneringen er ikke reversibel (Lasic, D. D. 1993, s. 109-154).

Liposomsuspensjoners stabilitet ovenfor aggregering og fusjonering kan beskrives ved hjelp av DVLO-teorien for kolloid stabilitet. Kolloide partikler er partikler i størrelsesordenen 1 nm-1 μm . I følge DVLO-teorien virker det attraktive van der Waals krefter og frastøtende elektrostatiske, steriske og hydreringskrefter mellom to kolloide partikler. Steriske krefter oppstår når partikler med adsorberte polymerlag kommer så nært hverandre at lagene overlapper. For å hindre aggregering og fusjonering må det være en tilstrekkelig frastøtende barriere, primært maksimum. En slik barriere kan oppnås for eksempel ved å benytte kolloider med ladning på overflaten og/eller dekke kolloidene med polymerer som gir sterisk frastøtning (Lasic, D. D. 1993, s. 265-321; Attwood, D. 2002, s. 79-84; Morfesis, A. 2008).

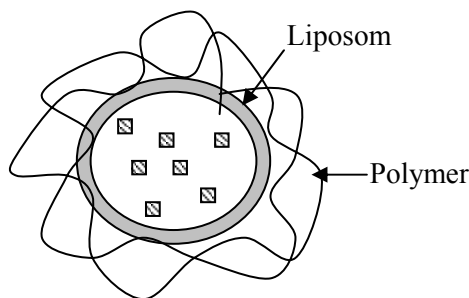
Inkorporering av ladet lipid i liposomer har i studier økt stabiliteten til liposomsuspensjoner (Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. 1994). Det er antatt at for rent elektrostatisk stabiliserte kollide systemer må zetapotenisalet være høyere enn ± 30 mV (Morfesis, A. 2008).

Lekkasjehastigheten fra liposomer er avhengig av dobbeltlagets sammensetning og legemidlets fysikalsk-kjemiske egenskaper (Lasic, D. D. 1993, s. 265-321; Zuidam, N. J. et al. 2003). For legemidler som bæres i liposomenes indre gir liposomer med mettede fosfolipider eller store mengder kolesterol den største permeabilitetsbarrieren (Zuidam, N. J. et al. 2003).

2.2.3 Overflatemodifisering av liposomer

Flere begrensninger ved konvensjonelle liposomer har fremmet forskningen på overflatemodifisering av liposomer. Kort sirkuleringstid i plasma (Storm, G. og Crommelin, D. J. A. 1998), dårlig fysikalsk og kjemisk stabilitet og liten grad av målstyring til virkestedet (Sunamoto, J. og Iwamoto, K. 1986) og dårlig stabilitet *in vivo* (Rogers, J. A. og Anderson, K. E. 1998) er eksempler på slike begrensninger. Dekking av liposomer med polymerer er en form for overflatemodifisering (Rogers, J. A. og Anderson, K. E. 1998).

Det ble tidlig vist at polysakkarider på liposomoverflaten kunne stabilisere liposomene (Sunamoto, J. og Iwamoto, K. 1986). Stabilisering mot lekkasje av legemiddel og fusjonering eller disintergrering er funnet for blant annet karboksymetylkitin (Kato, A. et al. 1984; Alamelu, S. og Rao, K. P. 1991; Mobed, M. og Chang, T. M. 1998), acacia-gelatin (Dong, C. og Rogers, J. A. 1993), den syntetiske polymeren poly(4-vinylpyridin) (Dong, C. og Rogers, J. A. 1992) og kitosan (Henriksen, I. et al. 1997; Laye, C. et al. 2008). Teoretisk sett forutsetter fysisk stabilisering av kolloide partikler ved hjelp av motsatt ladete polymerer at partiklene dekkes fullstendig, som vist i Figur 2-3 (McClements, D. J. 2005). Dersom bindingen mellom liposom og polymer er tilstrekkelig sterk, kan det gi den nødvendige beskyttelsen for oral administrasjon av liposomer (Rogers, J. A. og Anderson, K. E. 1998). Ved lokalbehandling av munnhulen er det mulig at polymerdekking kan beskytte liposomene mot karboksylaser og lipaser i saliva.



Figur 2-3: Sjematisk struktur av et legemiddelbærende liposom dekket av en polymer.

Flere studier har vist at liposomer som dekkes med mukoadhesive polymerer oppnår mukoadhesjon og gir økt absorpsjon av oralt administrerte peptider. Kitosan (Takeuchi, H. et al. 1994; Takeuchi, H. et al. 2003; Jain, A. K. et al. 2007), karbopol (Takeuchi, H. et al. 2003; Jain, A. K. et al. 2007) og pektin (Thirawong, N. et al. 2008) er eksempler på polymerer som har blitt benyttet til produksjon av mukoadhesive liposomer.

Metoder som har vært forsøkt for dekking av liposomer med polymerer, er enkel blanding av like volum liposomsuspensjon og polymerløsning (Takeuchi, H. et al. 1994; Takeuchi, H. et al. 2003; Takeuchi, H. et al. 2005), tilsetning av liposomer ved konstant hastighet til et overskudd polymerløsning (Henriksen, I. et al. 1997) og totrinns emulgeringsteknikk (Kato, A. et al. 1984).

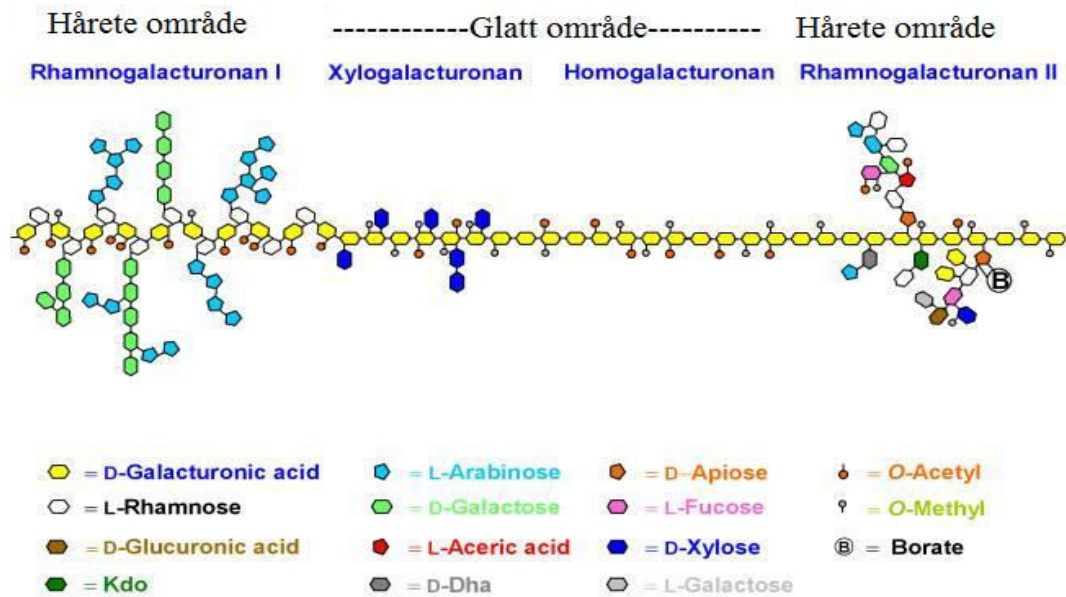
2.3 Pektin

Pektin er en gruppe relaterte, vannløselige polysakkarider som stammer fra primærcelleveggen og de intercellulære områdene hos høyere planter (Rolin, C. 1993; Voragen, A. G. J. et al. 1995). I plantevevet bidrar pektin til stivhet og struktur i cellemembranene og intercellulær adhesjon (Thakur, B. R. et al. 1997).

Hovedkildene til kommersielt pektin er tørkede rester etter pressing av eplejuice og tørket eller fuktig sitronskall og rester etter pressing av sitronsaft (Thakur, B. R. et al. 1997). Pektinet ekstraheres fra materialene ved sur hydrolyse med påfølgende opprensning og standardisering (Voragen, A. G. J. et al. 1995).

2.3.1 Kjemisk struktur

Pektinmolekylet beskrives som en sur hovedkjede, ”ryggrad”, med nøytrale sidekjeder bundet til (Voragen, A. G. J. et al. 1995). Sidekjedene forekommer i grenete blokker av molekylet, kalt hårete områder. Ugrenete blokker kalles glatte områder (Voragen, A. G. J. et al. 1995; Thakur, B. R. et al. 1997). Strukturen til pektin vises i Figur 2-4.



Figur 2-4: Foreslått struktur for pektinmolekylet (Scheller, H. V. 2007).

De glatte områdene

Ryggraden i de glatte områdene består av α -(1 \rightarrow 4)-bundet D-galakturonsyre enheter (Figur 2-5) med varierende andeler av syregruppene forestret med metanol (Voragen, A. G. J. et al. 1995).

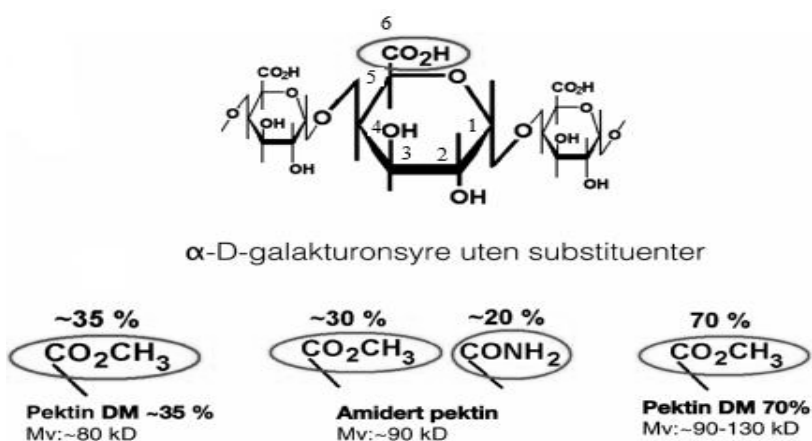
Metyleringsgraden, DM (degree of metylation), angir hvor stor molprosent av karboksylsyregruppene som er forestret med metanol (Figur 2-5). Pektin med DM >50 % kalles høymetoksyliert pektin, HM-pektin, mens pektin med DM <50 % kalles lavmetoksyliert pektin, LM-pektin. HM-pektin har vanligvis DM 55-75 % og LM-pektin har vanligvis DM 20-45 % (Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. 2002).

Hydrolysebetingelsene ved ekstraksjon av pektin påvirker pektinets DM.

Deestrisering til eksakt DM utføres vanligvis etter ekstraksjonen i alkohol tilsatt syre eller base (Rolin, C. 1993).

Ved å benytte amoniakk under deestriseringen av HM-pektin dannes amidgrupper og frie syregrupper. Pektin får da betegnelsen amidert pektin. Graden av amidering, DAM (degree of amidation) angir molprosent av karboksylsyregruppene som er amidert. DM og DAM for amidert pektin er typisk henholdsvis 30 og 20 % (Rolin, C.

1993; Voragen, A. G. J. et al. 1995; Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. 2002).



Figur 2-5: Strukturformelen til D-galakturonsyre, som utgjør ryggraden i de glatte områdene av pektinmolekylet. Nedre del viser metyleringsgrad for de vanligste pektintypene: LM-pektin (DM \approx 35), amidert pektin og HM-pektin (DM \approx 70) (Hagesaether, E. 2007).

Galakturonsyreenhetene kan også være substituert med acetylgrupper i O-2 eller O-3.

De hårete områdene

Ryggraden i de hårete områdene er oftest en heteropolymer, rhamnogalakturonan I, bestående av alternerende enheter av (1 \rightarrow 2)-bundet α -L-rhamnopyranose og α -D-galakturonsyre. Disse områdene bryter den regulære strukturen til homogalakturonankjeden i de glatte områdene og øker på den måten fleksibiliteten til kjeden (Figur 2-4) (Voragen, A. G. J. et al. 1995; Thakur, B. R. et al. 1997).

Sidekjedene i de hårete områdene av pektin er bygget opp av nøytrale sukkermolekyler. De vanligste sukrene er D-galaktose og L-arabinose (Voragen, A. G. J. et al. 1995).

2.3.2 Kjemiske egenskaper

Pektin er løselig i vann i løsninger opp til 3-4 % og uløselig i organiske løsemidler (Rolin, C. 1993). Løseligheten øker ved synkende molekylvekt og økende DM, men den kan endres vesentlig ved blant annet endringer i pH og ionestyrke i løsningen (Thakur, B. R. et al. 1997).

Pektin er en polykarboksylsyre. Den vil derfor være en negativt ladet polyelektrolytt ved nøytral pH og uten ladning ved lav pH. pKa for pektin varierer i litteraturen fra 3,5 til 4,5 (Rolin, C. 1993). Molekylets ladningstetthet ved en gitt pH-verdi øker ved synkende DM (Thakur, B. R. et al. 1997).

Viskositeten til pektinløsninger er blant annet avhengig av løsningens konsentrasjon, pH, temperatur og ionestyrke og pektinets molekylvekt og DM (Rolin, C. 1993).

2.3.3 Stabilitet

Kjemisk stabilitet

Pektinløsninger er utsatt for hydrolyse av metoksyl- og acetylgrupper og nøytrale sukkermolekyler fra sidekjedene. Hydrolysen er hovedsaklig avhengig av pH og temperatur. Stabiliteten er best ved pH 3-4 og reduseres særlig ved lavere pH, men også ved basisk pH (Voragen, A. G. J. et al. 1995). Ved pH under 3 kan hovedkjeden også depolymeriseres ved hydrolyse. Ved nøytral og basisk pH kan depolymerisering skje ved β -eleminering. β -elemineringen skjer raskere jo høyere metyleringsgrad pektinet har (Rolin, C. 1993; Voragen, A. G. J. et al. 1995; Thakur, B. R. et al. 1997).

Enzymatisk stabilitet

Pektin kan brytes ned av flere enzymer, pektinaser, som finnes både i høyere planter og mikroorganismer. Enzymene klassifiseres etter hvor de angriper pektin. Enkelt sett skilles det mellom pektin depolymeraser som bryter glykosidbindingene og pektin esteraser som deestrifiserer syregruppene (Voragen, A. G. J. et al. 1995). Pektin brytes verken ned av enzymer i saliva eller tynntarmen hos mennesker. Imidlertid brytes det raskt ned i tykktarmen, mest sannsynlig på grunn av bakterielle enzymer (Thakur, B. R. et al. 1997).

2.3.4 Anvendelse av pektin

Pektin regnes som trygg ved bruk av EUs vitenskaplige komité for mat, FDA og en sammenslått ekspertkomité for mattilsetninger bestående av representanter fra FAO (Food and Agricultural organization of United Nations) og WHO (Worlds Health Organization). Pektin har blitt benyttet som geldanner for syltetøy og geléer i tradisjonelt hushold svært lenge, og det er fremdeles hovedanvendelsesområdet for pektin (Rolin, C. 1993; Voragen, A. G. J. et al. 1995; Thakur, B. R. et al. 1997).

Helseeffekter som har vært studert for pektin er blant annet reduksjon av kolesterolnivået i blodet, reduksjon av koagulasjonstiden ved intravenøs administrasjon, antidiarretisk bruk for barn, reduksjon av fedme og behandling av magesår. Studier av planter brukt i folkemedisinen har vist at pektin har positive effekter på immunsystemet (Yamada, H. og Kiyohara, H. 2007).

Pektin alene eller i kombinasjon med andre polymerer har blitt brukt for å oppnå forlenget frisetting av legemidler og til å stabilisere emulsjoner (Thakur, B. R. et al. 1997).

Mukoadhesive egenskaper

Pektin oppgis ofte som en relativt svakt mukoadhesiv polymer sammenliknet med andre polymerer (Smart, J. D. et al. 1984; Yang, X. og Robinson, J. R. 1998; Nafee, N. A. et al. 2004), eller som ikke mukoadhesiv (Lehr, C. M. et al. 1992).

Flere studier har imidlertid vist at pektin har mukoadhesive egenskaper, men at mukoadhesiviteten trolig er avhengig av pektintype. Pektintypene varierer i egenskaper av betydning for mukoadhesivitet, som for eksempel molekylvekt, ladning og funksjonelle grupper (Yang, X. og Robinson, J. R. 1998; Hagesaether, E. og Sande, S. A. 2007). Derfor vil en generell klassifisering av pektin som en dårlig mukoadhesiv være en overforenkling (Hagesaether, E. og Sande, S. A. 2007). Flere studier har vist at LM-pektin har bedre mukoadhesive egenskaper enn HM-pektin. (Schmidgall, J. og Hensel, A. 2002; Liu, L. S. et al. 2005; Hagesaether, E. og Sande,

S. A. 2007; Hagesaether, E. og Sande, S. A. 2008) Andre studier har derimot vist best mukoadhesjon av HM-pektin (Takeada, C. et al. 2007; Thirawong, N. et al. 2007).

Enkelte studier har videre funnet at amidert pektin har større mukoadhesjon enn LM-pektin (Thirawong, N. et al. 2007), mens andre ikke har funnet økt mukoadhesjon ved å innføre amidgrupper i pektinmolekylet (Hagesaether, E. og Sande, S. A. 2007).

Pektins mukoadhesjon i munnhulen har blitt funnet til å være på samme nivå som i tynntarmen og i magesekken ved pH 4.8, og høyere enn i magesekken ved pH 1.2 (Thirawong, N. et al. 2007).

2.4 Karakterisering

2.4.1 Karakterisering av pektin

Kilde for råmaterialet, ekstraksjonsbetingelser og eventuell prosessering etter ekstraksjon gir variasjon i pektinet. Derfor må pektin karakterieres. De vanligste karakteristika som bestemmes er galakturonsyre innhold, esterifiseringsgrad, sammensetning av sukre, amideringsgrad og molekylvekt (Rolin, C. 1993; Voragen, A. G. J. et al. 1995). I denne oppgaven ble kun molekylvekt bestemt, da de andre relevante parametrene var oppgitt av produsenten.

Bestemmelse av molekylvekt

Nesten alle syntetiske og naturlig forekommende makromolekyler er polydisperse. Gjennomsnittlig molekylvekt kan oppgis på ulike måter, avhengig av metoden som benyttes for bestemmelsen. De vanligste målene er massegjennomsnittlig molekylvekt, M_w , antalls gjennomsnittlig molekylvekt, M_n , viskositetsgjennomsnittlig molekylvekt, M_v , og sedimenteringsgjennomsnittlig molekylvekt, M_z . Det massebaserte gjennomsnittet vil vektlegge kjeder med høyere molekylvekt mer enn M_n . Forholdet M_w/M_n kalles polydispersitetsindeksen (Florence, A. T. og Attwood, D. 1998, s. 313-314). Molekylvekten til pektin kan bestemmes ved flere metoder, blant andre

egenviskositetsmetoden (M_v), membran osmometri (M_n), analytisk senterifugering (M_z), lysspredningsmetoder (M_w) og kombinasjoner av metodene (Rolin, C. 1993).

Egenviskositetsmetoden

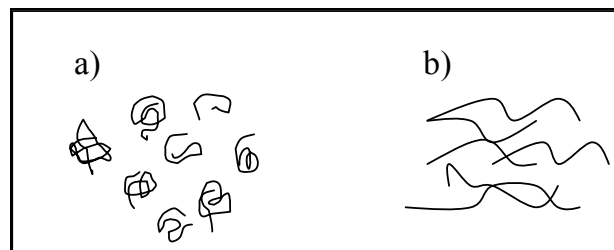
I denne oppgaven ble egenviskositetsmetoden benyttet til besemmelse av molekylvekt. M_v forventes å ligge nært M_w , men noe lavere (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005).

Molekylvekten til en polymer kan korreleres til egenviskositeten $[\eta]$, ”intrinsic viscosity”, ved hjelp av Mark-Houwink-Sakuradas likning: $[\eta] = K \times M^\alpha$. K og α er konstanter for det spesifikke polymer-løsemiddelsystemet ved en gitt temperatur (Mariott, C. 2002, s 41-48). Egenviskositeten til en polymer kan finnes ved hjelp av sammenhengen $\eta_{sp}/C = [\eta] + k'[\eta]^2 \cdot C$, der C er konsentrasjonen, k' er hugginskonstanten, og η_{sp} , er den spesifikke viskositeten definert som $\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1$. η_{rel} er relativ viskositet, definert som $\eta_{rel} = \eta / \eta_0$. η og η_0 er viskositet for henholdsvis polymerløsning og rent løsemiddel (Florence, A. T. og Attwood, D. 1998, s. 317-319). I praksis kan egenviskositeten finnes ved å måle utrenningstiden til et konstant volum rent løsemiddel og polymerløsninger av ulike konsentrasjoner i et kapillær viskosimeter (Ostwald eller Ubbelohde). For hvert konsentrasjonsnivå beregnes $\eta_{sp} = t/t_0 - 1$, hvor t = utrenningstid til polymerløsningen og t_0 = utrenningstid til løsemidlet. η_{sp}/C , som kalles redusert viskositet, plottes så mot konsentrasjon. $[\eta]$ er da grenseverdien for $\lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp}/C$. Konsentrasjonsnivåene bør velges slik at η_{rel} ligger i området 1,2-2,2. $[\eta]$ oppgis i dl/g og konsentrasjonene angis i g/dl (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005).

Hugginskonstanten, k'

Hugginskonstanten er karakteristisk for et gitt polymer-løsemiddelsystem. Konstanten er avhengig av størrelse og form på løsemiddel-molekylene og makromolekylet, samt de kohesive kreftene som virker mellom løsemiddel-molekyler og funksjonelle grupper i makromolekylet. Kjedelengden til makromolekylet antas å ikke ha betydning (Huggins, M. L. 1952). Den fysikalsk-kjemiske betydningen av

hugginskonstanten kan oppsummeres på denne måten: (a) Polymerer har en høyere k' verdi i et dårlig enn i et godt løsemiddel. I slike systemer dominerer de intramolekylære kreftene i polymeren over de intermolekylære kreftene mellom polymer og løsemiddel, slik at kjedene sammenkveiles (Figur 2-6); (b) k' ligger mellom 0,5 og 0,7 i et theta-løsemiddel; og (c) k' er veldig sensitiv for tilstedeværelse av molekylære aggregater (Sakai, T. 1968). Med theta (θ)-tilstand menes at entalpien som tas opp ved blanding nøyaktig balanserer frigjort entropi ved blanding, slik at løsningen oppfører seg som en ideell løsning (Elias, H.-G. 1997). I denne oppgaven ble hugginskonstant for pektin i det aktuelle løsemidlet bestemt for å vurdere molekylenes konformasjon.

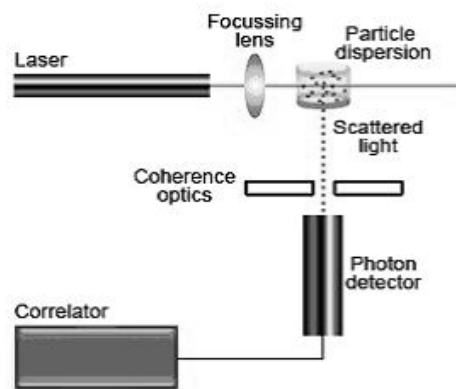


Figur 2-6: Figuren illustrer polymerkjeder i a) et termodynamisk dårlig løsemiddel med høy k' og b) et termodynamisk godt løsemiddel med lav k' .

2.4.2 Partikkelstørrelsesmåling ved foton korrelasjons spektroskopi (PCS)

Dispersjoner av kolloide partikler er utsatt for tilfeldig kollisjoner med molekyler av dispersjonsmediumet i bevegelse. Dette medfører at partiklene beveger seg i irregulære mønstre, en bevegelse som kalles Brownsk bevegelse (Attwood, D. 2002).

Ved foton korrelasjons spektroskopi (PCS) sendes laserlys (helium-neon eller argon) mot en fortynnet partikkelsuspensjon i en kuvette plassert i en termostatisk kontrollert celle. Det spredde lyset detekteres i en vinkel på 90° i forhold til det innsendte lyset (Figur 2-7).



Figur 2-7: Skjematisk illustrasjon av apparaturen for foton korrelasjons spektroskopi (Malvern Instruments Ltd 2009).

Prinsippet for PCS er at den brownske bevegelsen gir fluktering i intensiteten av spredd lys når partiklene bestråles over tid (Zuidam, N. J. et al. 2003). Intensiteten av det spredde lyset er avhengig av den komplekse interferensen mellom lyset spredd av hver partikkel og endres derfor når partiklene beveger seg. Små partikler beveger seg raskere enn store partikler. Når partiklene beveger seg raskere, vil interferensmønsteret av spredd lys skifte raskere, slik at økt fluktering i intensitet måles. Flukteringsmønsteret over tid brukes til å beregne diffusjonskoeffisienten til partiklene i mediumet. Denne brukes videre til å beregne størrelse, hydrodynamisk diameter, ved hjelp av Stoke-Einsteins likning. For beregningen må mediumets temperatur og viskositet være kjent. Hydrodynamisk diameter er diameteren til en sfærisk partikkel med samme diffusjonskoeffisient i mediumet (Zuidam, N. J. et al. 2003).

Bredden på fordelingen oppgis ved en polydispersitetsindeks (PI). Ved $PI > 0,7$ er fordelingen svært bred og polydispers. Slike prøver kan være utenfor det egnede området til PCS-teknikken, fordi det i halene av fordelingene ofte er partikler som er så store at de sedimenterer (Morfesis, A. 2008).

Resultatene fra PCS kan analyseres ved flere analysemetoder. I denne oppgaven er CONTIN-analyse benyttet. Den gir en enkel beskrivelse av fordelingen og kan

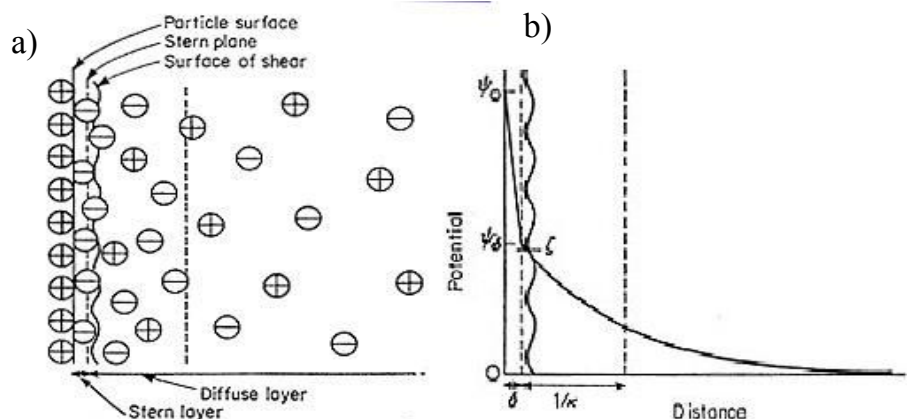
avdekke om fordelingen har én eller flere topper, men oppløsningen er ikke høy (MAN0149 Malvern Instruments Ltd 2000).

2.4.3 Zetapotensiale

De fleste overflater får ladning når de kommer i kontakt med et vandig medium. Tre kjente mekanismer for dannelse av ladningen er a) ujevn frisetelse av ioner fra overflaten, b) ionisering av overflategrupper og c) ujevn adsorpsjon av ioner fra mediumet (Attwood, D. 2002).

Ladningen til overflaten påvirker hvordan ioner i det vandige mediumet vil fordele seg i forhold til overflaten. På grunn av elektrostatisk tiltrekking vil ioner få høyest konsentrasjon nært overflaten og synkende konsentrasjon ved økende avstand. Ioner av samme ladning som overflaten vil på grunn av frastøtning få motsatt fordeling i mediumet. Resultatet av dette er et elektrisk dobbellag bestående av et indre lag (Stern lag) med tett adsorberte ioner og et ytre, diffust lag hvor ionene er påvirket av elektriske krefter og tilfeldig termal bevegelse. Ladningen synker fra overflateladningen, ψ_0 , til ladningen ved Stern planet, ψ_δ , og mot 0 i det diffuse laget (Attwood, D. 2002).

I det diffuse laget er en viss mengde løsemiddel bundet til overflaten. Grensen for dette laget av bundet løsemiddel kalles skyveplanet, og ladningen her kalles zetapotensialet, ζ (Figur 2-8). Tykkelsen på det elektriske dobbellaget angis som Debye-Huckels lengde parameter, $1/\kappa$. κ øker ved økende elektrolyttkonsentrasjon i mediumet. Dermed vil økende elektrolyttkonsentrasjon komprimere det elektriske dobbellaget. Dette medfører en reduksjon i zetapotensiale (Attwood, D. 2002). Av denne grunn er det viktig at zetapotensialet måles i det aktuelle mediumet for partiklene.



Figur 2-8: Betydningen av zetapotensiale: a) Fordelingen av motioner ved en ladet overflate, b) potensialet ved ulike avstander til overflaten. ψ_0 = overflateladning, ψ_δ = ladningen i Stern planet og ζ = zetapotensialet (Brookenhaven Instruments Ltd 2009).

Elektroforese er en metode for måling av zetapotensiale (Attwood, D. 2002; Zuidam, N. J. et al. 2003; Morfesis, A. 2008). Når ladete partikler suspendert i et vandig medium påføres et kjent elektrisk felt, vil partiklene beveges mot elektroden av motsatt ladning. Hastigheten er avhengig av feltstyrke, mediumets viskositet og dielektrisitetskonstant og partiklenes zetapotensiale (Morfesis, A. 2008). Hastigheten partiklene beveger seg med kan finnes ved hjelp av frekvensen av Doppler skift til lys som spres fra partiklene i bevegelse (Zuidam, N. J. et al. 2003). Teknikken kalles da mikroeletroforese (Attwood, D. 2002).

Den elektroforetiske mobiliteten til partiklene er definert som hastighet delt på feltstyrke og kan relateres til zetapotensiale ved hjelp av Henrys likning. For å beregne zetapotensiale på grunnlag av elektroforetisk mobilitet kreves det at dielektrisitetskonstant og viskositet av mediumet er kjent (Morfesis, A. 2008).

2.5 Statistisk forsøksplanlegging, faktorielle design og multivariat dataanalyse

2.5.1 Statistisk forsøksplanlegging

De fleste fenomener i naturen er multivariate, det vil si at de er avhengige av flere variable samtidig (Esbensen, K. H. 2006, s. 1).

Den tradisjonelle framgangsmåten for å undersøke slike fenomener er å variere en variabel av gangen. Hovedulempen med dette er at eventuelle samspill mellom variablene ikke oppdages og at det må gjøres mange forsøk for å nå målet (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

Statistisk forsøksplanlegging, eller eksperimentell design, er et verktøy for systematisk undersøkelse av ulike multivariable problemer. Prinsippet er at flere variabler varieres samtidig, slik at maksimal informasjon trekkes ut av minimalt antall forsøk (Thelin, B. et al. 1996). Faktorforsøk er en metode innen eksperimentell design.

2.5.2 Faktorforsøk

Faktorforsøk går ut på at man undersøker hvordan en eller flere responser varierer ved endring av de eksperimentelle variablene, faktorene (Thelin, B. et al. 1996). Hver faktor studeres på få nivåer, vanligvis kun to, og man undersøker ulike kombinasjoner av faktorenes nivåer (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

Fullfaktorielle forsøk

I fullfaktorielle forsøk undersøker man samtlige kombinasjoner av k faktorer på to nivåer. Dette medfører et design med 2^k forsøkspunkt. Verdiene av nivåene for hver faktor bestemmes etter rimelig variasjon for den aktuelle faktoren (Guyot, D. 2006, s. 361-447). I tillegg undersøkes senterpunktet, der alle faktorene holdes på sin middelvei (Thelin, B. et al. 1996).

Fordelen med fullfaktor forsøk er at alle hovedeffekter og interaksjonseffekter kan estimeres. En hovedeffekt er effekten på en respons ved endring i variabelen fra lavt til høyt nivå, og den beregnes som en lineær effekt. En interaksjonseffekt vil si at endring i verdien av den ene variabelen påvirker den andre variabelens effekt på responsen (Guyot, D. 2006, s. 361-447). Senterpunkt kan brukes til å anslå eventuelle krumninger i effekten av variabler og den eksperimentelle feilen (Thelin, B. et al. 1996).

Ulempen med fullfaktorielle design er at ved økende antall variabler blir antall forsøk svært høyt (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

Reduserte faktorforsøk

Ved reduserte faktorforsøk gjøres kun en fraksjon av forsøkene i et fullfaktorielt design. Fraksjonen velges slik at det med langt færre forsøk kan estimeres hovedeffekter og eventuelt noen av interaksjonene, men ikke alle mulige interaksjoner. Antall forsøk beregnes da til 2^{k-p} , hvor p er fraksjoneringsgraden i forsøket (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

En ulempe med reduserte faktorforsøk er at effekter sammenblandes, det vil si at de ikke kan studeres uavhengig av hverandre (Guyot, D. 2006, s. 361-447). Graden av sammenblanding oppgis som oppløsningen til forsøket. Jo høyere oppløsning, jo mindre sammenblanding. I det reduserte faktorforsøket i dette arbeidet ble oppløsning IV benyttet. Da er hovedeffekter sammenblandet med tre-faktor interaksjoner og to-faktorinteraksjoner sammenblandet med hverandre (Thelin, B. et al. 1996).

Reduserte faktorforsøk benyttes ofte til screeningforsøk, hvor målet er å finne ut hvilke faktorer som er av betydning for et system (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

Optimaliseringsdesign

Optimaliseringsdesign benyttes til å undersøke et lavt antall faktorer (2-5) på flere enn to nivåer. Valget av faktorene gjøres på bakgrunn screeningstudier. Hensikten med optimaliseringsdesign er å finne en mer kompleks modell for variablenes effekt på

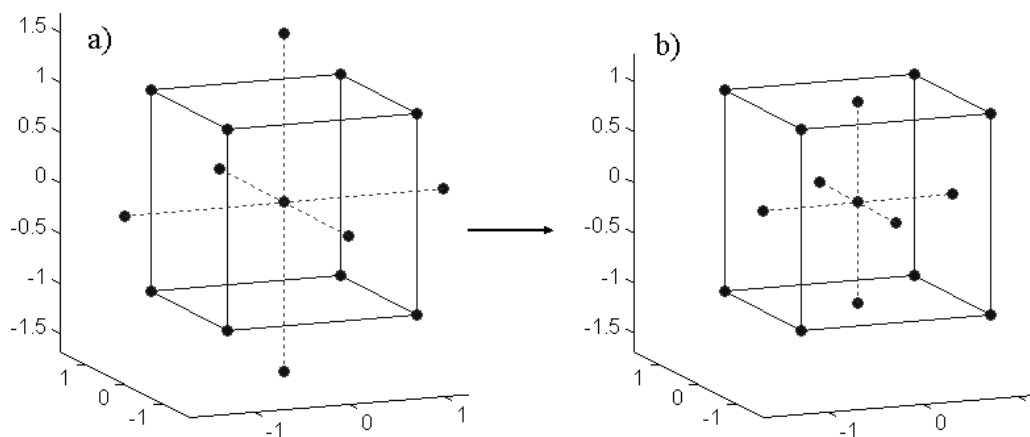
responsen, slik at optimal faktorsammensetning til et ønsket formål kan bestemmes (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

Central Composite design (Guyot, D. 2006, s. 361-447)

Central composite er et optimaliseringsdesign for undersøkelse av 2-6 variabler og er egnet dersom man ønsker å utvide et fullfaktorielt forsøk eller et redusert faktorforsøk. Designet består av alle forsøkpunktene og senterpunktene fra et fullfaktorforsøk, i tillegg til et stjernepunkt for hver variabel (Figur 2-9 a).

Stjernepunkt er punkt der alle variablene holdes på sitt middelsnivå unntatt én, som har en ekstremverdi. Dette medfører at 5 nivåer av hver faktor undersøkes.

Dersom det ikke er ønskelig å benytte ekstremverider av variablene, kan man skyve stjernepunktene inn til maks verdi av hver variabel istedet (Figur 2-9 b). Da undersøkes kun 3 nivåer av hver faktor, og modellen som lages kan ikke inneholde høyere ledd enn annengradsledd. I dette arbeidet ble et central composite design med innflyttede stjernepunkter benyttet.



Figur 2-9 Central composite design til optimalisering, her vist for tre variable faktorer. a) Design med stjernepunkter som ekstrempunkter utenfor kubens flater. b) Design med stjernepunkter forskjøvet til kubens flater (The MathWorks 2009).

2.5.3 Multivariat dataanalyse

Ved multivariat dataanalyse dekomponeres et multivariabelt datasett for å finne en skjult struktur. Dersom det lages en modell for en eller flere responsvariabler (Y) ved å korrelere variasjonen i denne/disse variablene til variasjonen i et sett X-variabler, kalles det multivariabel kalibrering. Etter kalibreringen må modellen valideres, det vil si testes for evne til å predikere Y-verdier utfra nye X-verdier (Esbensen, K. H. 2006, s.115-153). Full kryssvalidering er en av flere valideringsmetoder. Denne utføres ved at programmet holder én og én prøve utenfor modelleringen og predikerer verdien til prøvene ved hjelp av undermodellen de ikke var med på å lage. Da den egentlige Y-verdien til prøvene er kjent, kan prediksjonsevnen til modellen i sin helhet beregnes (Esbensen, K. H. 2006, s. 155-170).

Det finnes flere multivariate analysemetoder, og valget er avhengig av hensikt med analysen og type datasett. I denne oppgaven ble det hovedsaklig benyttet PLS-1.

PLS-1 (Partial Least Squares regression)

Ved PLS-1 projeses X-data ned på et mindre antall underliggende variabler, principal komponenter (PCer), dirigert av variasjonen i én Y-matrix. Den første komponenten, PC1, er den variasjonsretningen i data som har størst variasjon dirigert av variasjonen i Y-data (Esbensen, K. H. 2006, s.115-155). Hver nye komponent ligger vinkelrett på den forrige og forklarer mer av variasjonen i Y (Esbensen, K. H. 2006, s. 171-174). I regresjonen korreleres variasjonen i X til variasjonen i Y, og korrelasjonskoeffisientene benyttes til å estimere regresjonskoeffisientene i modellen (Esbensen, K. H. 2006, s. 115-155). De viktigste plottene fra en PLS-1 analyse er presenteret kort nedenfor.

Plottet for de vektete regresjonskoeffisientene viser betydningen til effektene i form av størrelsen til vektete regresjonskoeffisienter. Ved kryssvalidering kan variasjonen til koeffisientene mellom hver submodell benyttes til å beregne om effekten er signifikant ($p < 0,05$). Dette gjøres ved jack knife testing (Esbensen, K. H. 2006, s. 214, s. 327). Plottet for predikert mot målt verdi av prøvene viser modellens presisjon.

Gjennomsnittlig avstand mellom målt og predikert prøve angis ved RMSEC (root mean square error of calibration) for kalibreringssettet og RMSEP (root mean square error of prediction) for valideringsprøvene (Esbensen, K. H. 2006, s. 200-211).

Residual-Y varians-plottet viser resterende varians i Y mot antall PCer (Esbensen, K. H. 2006, s.201-202). Ladningsplott viser variablenes ladning ved to komponenter. X-variabler med høye ladninger er viktige for å forklare Y-variasjonen. Scoreplottet viser prøvenes lokasjon langs to komponenter og kan brukes til å detektere mønstre, grupperinger og uteliggere (Esbensen, K. H. 2006, 549-586). Influenceplottet viser leverage, påvirkning på modellen, mot residual for hver prøve. Plottet kan brukes til å avdekke prøver med høy leverage og høyt residual, som er mulige uteliggere (Esbensen, K. H. 2006, s. 97-102).

Andre aktuelle multivariate analyser

MLR (multippel lineær regresjon) er en klassisk analysemetode hvor det utføres en direkte regresjon mellom Y og en X-matrix. Metoden forutsetter at X-variablene er uavhengige, at det er lite støy i X-matrix og at det ikke er flere variabler enn prøver (Esbensen, K. H. 2006, s. 115-155). Det vil derfor være godt egnet til designede faktorforsøk dersom ingen prøver mangler.

På bakgrunn av MLR-analysen kan det lages ANOVA-tabeller for modellen og modellparametrene. ANOVA (ANalysis Of VAriance) er en metode som beregner signifikans av effekter ved å sammenlikne variasjonen som følge av en effekt med tilfeldig variasjon. Beregningen gjøres ved å finne en F (fisher)–observator. F-observator finnes ved å dele gjennomsnittlig kvadratsummer for variasjonen som følge av hver effekt på gjennomsnittlig kvadratsummer for tilfeldig variasjon. Observatoren har en F-fordeling som benyttes til å vurdere om den er tilstrekkelig stor til at effekten er signifikant. Resultatene oppgis i ANOVA-tabeller over kvadratsummer (SS), gjennomsnittlige kvadratsummer (MS), F-observatorer, regresjonskoeffisienter (B), antall frihetsgrader og p-verdier (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

PCA er en bilineær metode som likner PLS-1, men uten noen definert Y-variabel. Informasjonen i de originale variablene projесeres ned til et mindre antall underliggende variabler, prinsipalkomponenter. Dette gir god oversikt over skjulte trender, grupperinger, uteliggere og korrelasjoner mellom X-variabler i multivariable datasett (Esbensen, K. H. 2006, s. 19-72). I dette arbeidet ble PCA benyttet til å se på sammenhengen mellom flere responsvariabler.

3. Materialer og instrumenter

3.1 Materialer

Lipider

Lipid	Forkortelse	Produsent	Ladning
Dipalmitoyl phosphatidyl choline	DPPC	Lipoid, GmbH, Tyskland	Zwitterionisk
Dipalmitoyl phosphatidyl glycerol	DPPG	Lipoid, GmbH, Tyskland	Negativt
Egg-phosphatidyl choline	Egg-PC	Lipoid, GmbH, Tyskland	Zwitterionisk
1,2-Dipalmitoyl-3- Trimethylammonium propan	DPTAP	Avanti Polar Lipids Inc, USA	Positiv
1,2-Dioleoyl-3- Trimethylammonium propan	DOTAP	Avanti Polar Lipids Inc, USA	Positiv

Pektin

Pektin	Produkt navn	Grad av estrifisering	Produsent
LM-pektin	Genu ® pectin LM12 CG-Z	34,8	CPKelco, Tyskland
HM-pektin	Genu ® pectin 150 USA-SAG	70,2	CPKelco, Danmark
Amidert pektin	Genu ® pectin LM-102 AS	Ikke oppgitt	CPKelco, Danmark

Andre kjemikalier

Stoff	Kvalitet	Produsent
Kloroform	pro analysis	Merck, Tyskland
Metanol	pro analysis	Merck, Tyskland
di-Natrium hydrogenfosfat-Dihydrat	pro analysis	Merck, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat-Monohydrat	pro analysis	Merck, Tyskland
Natrium heksametafosfat	pro analysis	VWR International Ltd, England
Rykende saltsyre 37%	pro analysis	Merck, Tyskland

3.2 Løsninger

3.2.1 Natrium heksametafosfat ((NaPO₃)₆) 1%

10,0 g natrium heksametafosfat ((NaPO₃)₆) ble overført til en 1000 ml målekolbe og løst i 800 ml destillert, ionebyttet vann. pH ble justert til $4,5 \pm 0,1$ med noen dråper 37% HCl. Deretter ble det fylt opp til merket med destillert, ionebyttet vann. pH ble kontrollert og justert igjen til $4,5 \pm 0,1$ med noen dråper 37% HCl.

3.2.2 5 mM fosfatbuffer pH 7,0

345 mg natriumdihydrogenfosfat (NaH₂PO₄·xH₂O) og 445 mg dinatriumhydrogenfosfat (Na₂HPO₄·2H₂O) ble veid ut på finvekt og løst i 1000 ml destillert, ionebyttet vann i målekolbe. pH ble justert til $7,0 \pm 0,1$ med noen dråper 1,0M NaOH. Løsningen ble så filtrert gjennom 0,2 µm Anopore uorganisk membranfilter (Anodisc 47) og overført til støvfri glassflaske.

3.3 Instrumenter

3.3.1 Opprensning og karakterisering av pektin

Senterifuge , modell MP4, serie nr.: 24373087	International Equipment Company, USA
Dialyse : Spectra/Por® 6 Dialysis Membrane MW-cutt of: 8000 Daltons. Volum: 8ml/cm. Prod. Nr: 132 586	Spectrum Laboratories Inc, USA
Viskositetsmåling : Micro-Ostwald viskosimeter, kapillær type 51613 Med tilhørende utstyr: Viscosity Measuring unit, Avs 310 og Bath Thermostat CT	Schott Geräte GmbH, Tyskland
Metanolbad : Hetofrig	Heto Birkerød, Danmark
Frysetørker : Christ Alpha-2-4 frysetørker med kontrollenhet LDC-1M Tilhørende vakuumpumpe, modell RV8	Martin Christ Gefriertrocknungs- anlagen GmbH, Tyskland Edwards High Vacuum International, England

3.3.2 Produksjon av pektindekkede liposomer

Finvekt : Ag204 DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH, Sveits
Rotavapor : Membran Vakuumpumpe, Type Mz 2C, serie nr.:23911722. Tilhørende vannbad, kjøleverk og styreenhet	Vacuubrand GmbH, Tyskland Heideldorph, Tyskland
Ekstruder : Thermobarrel extruder. Sirkulerende termostatisk vannbad, type GD120, serie nr: GM0135020	Lipex Biomembranes INC, Canada Grant Instruments Ltd, England
Slangepumpe , type 520 S/R	Watson-Marlow Bredel Pumps, UK

3.3.3 Måling av partikkelstørrelse og zetapotensiale

Til partikkelstørrelse: Malvern Zetasizer 1000	Malvern Instruments Ltd, England
Til zetapotensiale: Malvern Zetasizer 2000	Malvern Instruments Ltd, England

3.3.4 Diverse utstyr

UV-VIS Recording spectrophotometer UV-160A	Shimadzu Corporation, Japan
Ultracentrifuge: Optima MAX Ultracentrifuge 130 000 rpm	Becmann, USA
Rotor type 50, MLA 80	Beckmann, USA
Polykarbonat senterifuge rør, 16x64mm, 10 ml. Nr: 355647	Beckmann, USA
pH-meter type MP220	Mettler-Toledo GmbH, Sveits

4. Metoder

4.1 Opprensing av pektin

Pektin ble løst i destillert vann ved romtemperatur til konsentrasjonen 1,5 % (w/w). Oppløsningen ble utført under omrøring på magnetrører over natt. Pektinløsningene ble senterifugert 2 x 60 minutter ved 4600 rpm med dekantering mellom hver senterifugering. Supernatantene ble overført til dialyseslanger med molekylvekt cutt off på 8000 Dalton. Dialyseslangene ble plassert i 1000 ml målesylindere som ble fylt med destillert vann og satt i kjøleskap. Dialyseringen foregikk ved 4°C og vannet ble skiftet minimum 7 ganger (4-7 timer mellom hver gang). Løsningene ble overført til 1 liters rundkolber som hver ble fylt ca $\frac{1}{4}$ fulle. Løsningene ble frosset ned ved 10 minutter automatisk rotering i metanolbad, -40°C. Dette ga $\frac{1}{2}$ -2 cm tykke lag i kolbene. Kolbene ble umiddelbart etter nedfrysning montert på frysetørker og frysetørket i to døgn. Etter frysetørkingen ble pektinet overført til plastbokser og oppbevart i kjøleskap.

4.2 Fremstilling av liposomer

Stamløsninger i kloroform av et hovedlipid og et ladet lipid ble blandet i 250 ml rundkolber. Mengde og forhold mellom disse løsningene varierte med ønsket lipidkonsentrasjon og molprosent av ladet lipid. Kloroform:metanol (2:1) ble tilsatt til samme volum som ønsket volum av liposomsuspensjonen. Kloroform og metanol ble dampet av på rotavapor, 90-120 rpm rotering, under vakuum ved 40°C. Kolbene ble hengende på rotavaporen 20 minutter etter at filmene hadde blitt tørre. Rundkolbene ble satt på vakuumpumpe over natt for å fjerne løsemiddelrester. 10 ml 5 mM fosfatbuffer, pH 7 (kap 3.2.2) ble deretter tilsatt forsiktig under manuell svinging. Suspensjonen ble hydrert på rotavapor med 90 rpm rotering i 10 minutter. Liposomsuspensjonene fikk svulle i 2 timer og ble så plassert i kjøleskap for henstand

over natt. Liposomene ble tilslutt størrelsesreduert ved ekstrudering 10 ganger gjennom to polykarbonat membranfiltre med porestørrelse 200 nm. Hetteglassene liposomene ble ekstrudert ned i, var på forhånd skylt med 5mM fosfatbuffer, pH 7. Hetteglassene ble falsert og satt i kjøleskap.

For liposomer med DPPC som hovedlipid ($T_c=41^{\circ}\text{C}$) ble lipidfilmene og hydreringsmediet varmet til 70°C før hydrering. Hydreringen, svelling og ekstrudering foregikk også ved denne temperaturen, henholdsvis i vannbad, varmeskap og ekstruder.

For liposomer med egg-PC som hovedlipid (umettet) ble lipidene beskyttet for lys under produksjonen. Rundkolbene og hetteglassene ble fylt med N_2 -gass før henholdsvis svelling og falsering. Hydrering, svelling og ekstrudering foregikk ved romtemperatur.

4.3 Fremstilling av pektinløsinger

Pektin ble løst i 5 mM fosfatbuffer, pH 7 (kap 3.2.2) ved omrøring på magnetrører over natt. Oppløsningen ble utført ved romtemperatur. For å redusere risikoen for støv og partikler, ble pektinløsningene filtrert én gang gjennom ett $2\text{ }\mu\text{m}$ polykarbonatmembranfilter ved 45°C . Filtringen ble utført ved hjelp av ekstruder minimum 15 min etter eventuelle fortynninger.

4.4 Dekking av liposomer med pektin

Dekking av liposomer med pektin ble utført ved romtemperatur. Glassutstyr var på forhånd skylt med destillert, ionebyttet vann og 5 mM fosfatbuffer, pH 7 (kap 3.2.2).

Ved tilsetning av liposomer til pektin, ble hetteglass (str. 10 ml) med 4 ml pektinløsning satt under omrøring på magnetrører. 1 ml liposomsuspensjon ble

overført til et 20 ml begerglass og dryppet til ved hjelp av slangepumpe med silikonslange (1 mm indre diameter og 3 mm ytre diameter).

Ved tilsetning av pektin til liposomer, ble hetteglass (str. 10 ml) med 1 ml liposomsuspensjon satt under omrøring på magnetrører. 4 ml pektinløsning ble overført til et 20 ml begerglass og dryppet til ved hjelp av slangepumpen.

I begge tilfeller ble omrøringshastigheten, 250-700 rpm, valgt slik at det i hetteglasset ble dannet synlig virvel i løsningen/suspensjonen. Omrøringen fortsatte i 5 minutter etter tilsetningen, før hetteglassene ble falsert og satt til henstand i kjøleskap over natt. I de prøver hvor egg-PC var hovedlipid i liposomsuspensjonen, ble hetteglassene fylt med nitrogengass før falsering.

4.5 Vasking av pektindekkede liposomer (Ultrasentrifugering)

Sentrifugerørene ble skylt med destillert, ionebyttet vann og 5 mM fosfatbuffer, pH 7 (kap 3.2.2). Pektindekkede liposomer (0,5-4 ml) ble overført til 10 ml polykarbonat senterifugerør og fortynnet til 5 ml med fosfatbufferen. Ett kontrollrør med bare pektinløsning av den aktuelle pektintypen ble tillaget på tilsvarende måte, men volumene ble justert slik at pektinkonsentrasjonen i senterifugerøret ble lik pektinkonsentrasjonen i senterifugerør med pektindekkede liposomer.

Ultrasentrifugen ble innstilt på hastighet (rpm), temperatur og tid (Tabell 4-1).

Mellom hver senterifugering ble supernatantene pipettert av og pelletene resuspendert i 5 ml fosfatbuffer. Det ble kontrollert at det ikke ble dannet pellet i kontrollrørene. Pelletene ble tilslutt resuspendert i samme volum fosfatbuffer som opprinnelig uttak fra prøven.

Tabell 4-1: Senterifugebetingelser anvendt for pektindekkede liposomer.

Pektindekkede liposomer	Senterifugehastighet (rpm)	Tid	T (°C)
LM-pektin	35 000	2*1 time	4
HM-pektin	17 000, 16000	1 time ved hver hastighet.	20
Amidert pektin	17 000, 16000	1 time ved hver hastighet.	20

4.6 Måling av partikkelstørrelse (PCS)

Partikkelstørrelse ble målt ved foton-korrelasjon-spektroskopi (PCS) på Zetasizer 1000.

Engangskyvetter ble skylt med destillert, ionebyttet vann før tillaging av prøver, for å redusere sannsynligheten for støv. 1,5-2,5 ml 5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2) ble overført til en sprøyte og filtrert ned i kyvettene gjennom 0,22 µm filter. Deretter ble liposomsuspensjon (10-25 µl) eller pektindekkede liposomer (30-125 µl) tilsatt og blandet forsiktig med bufferen. Volumene av fosfatbufferen og prøvene var avhengig av prøvens konsentrasjonen og ble valgt slik at count rate under størrelsesmålingene lå i anbefalt område (50-500 KCps). Kyvettene ble kontrollert for støv innvendig og utvendig og plassert i den termokontrollerte cellen. Målingene ble gjort ved 90° vinkel og 25°C. Verdier for viskositet og dielektrisitetskonstant ble lagt inn i dataprogrammet. Verdiene for vann ved 25°C ble valgt. Dette var 0.89 cP og 79 for henholdsvis viskositet og dielektrisitetskonstant. Før måling ble prøvene temperert 5 minutter i apparatet. Hver prøve ble målt 3 ganger og analysert ved Contin analyse.

4.7 Måling av zetapotensiale

Zetapotensiale ble målt ved hjelp av mikroelektroforese på Zetasizer 2000.

Prøvene ble fortynnet 60 µl-400 µl pektindekkede liposomer og 60 µl-200 µl liposomer til 2-3 ml 5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2). Volumene av fosfatbufferen og prøvene var avhengig av prøvenes konsentrasjonen. Kapillæret ble fylt med 5 ml 5

mM fosfatbuffer pH 7 før prøvene ble innført. Kapillæret ble kontrollert for fravær av luftbobler. Verdier for dielektrisitetskonstant og viskositet ble lagt inn i dataprogrammet. Verdiene for vann ved 25°C ble valgt. Dette var 0,89 cP og 79 for henholdsvis viskositet og dielektrisitetskonstant. Målingene ble utført ved 25°C og hver prøve ble målt 5 ganger.

Mellom hver prøve ble kapillæret vasket med 10 ml destillert, ionebyttet vann filtrert 0,2 µm, 10 ml 96 % (v/v) etanol og 30 ml destillert, ionebyttet vann filtrert 0,2 µm.

4.8 Måling av pH

pH-meteret ble kalibrert hver prøvedag. 100 µl pektindekkede liposomer og pektinløsninger ble overført til eppendorfrør (str. 500 µl). Elektroden ble skylt med destillert, ionebyttet vann, tørket lett av og plassert i prøveløsningen ved romtemperatur. Under målingen ble elektroden holdt i bevegelse. Hver prøve ble målt én gang.

Ved justering av pH for fosfatbuffer (kap 3.2.2) ble samme metode benyttet, men med 5 ml som prøvevolum.

4.9 Måling av turbiditet

Spektrofotometeret ble innstilt på 550 nm og kvantitativ absorpsjonsmåling.

Kvartskyvetter ble skylt med destillert, ionebyttet vann og 5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2). Fosfatbufferen ble også brukt som blindprøve. Apparatet ble nullstilt ved hjelp av to kvartskyvetter med blindprøve. Deretter ble 2 ml av prøvene overført til kvartskyvetter og målt mot blindprøve. Det ble gjort 3 målereplikater på hver prøve.

4.10 Karakterisering av pektin

4.10.1 Bestemmelse av molekylvekt

For hver pektintype ble det laget 0,5 % (w/w) stamløsninger av rensset pektin i 1 % natrium heksametafosfat (kap 3.2.1). Fra disse løsningene ble det laget 5 fortynninger for hver pektintype (Tabell 4-2).

Fortynningene stod til omrøring 5 minutter på magnetrører før måling av utrenningtid for å sikre homogen pektinfordeling.

Tabell 4-2: Fortynningsrekkene for måling av pektinets egenviskositet.

Pektintype	Fortynninger (w/w%)				
HM-pektin	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1
Amidert pektin	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1
LM-pektin	0,275	0,25	0,2	0,15	0,1

Utrenningstidene for 2 ml av 1 % natrium heksametafosfat og pektinløsningene ble målt med et Micro-Ostwald viskosimeter, kapillær type 51613. Temperaturen i vannbadet var 25°C og kapillær med prøve ble tempererte 5 minutter i dette før målingene. Det ble utført 3 målereplikater for hver konsentrasjon. Mellom hver løsning ble kapillæret vasket 2 ganger med destillert vann, 2 ganger med aceton og tørket med N₂-gass.

Den spesifikke viskositeten for hver konsentrasjon av alle pektintypene ble beregnet ved hjelp av sammenhengen $\eta_{sp}=t/t_0-1$, der t = gjennomsnittlig utrenningstid for prøve, t_0 =gjennomsnittlig utrenningstid for løsemiddel (kap 2.4.1). Redusert viskositet, η_{sp}/C , ble deretter plottet mot konsentrasjon. Egenviskositeten, $[\eta]$, ble funnet som skjæringen mellom grafen og Y-aksen.

Hugginskonstanten, k' , ble beregnet ut fra likningene til grafene for redusert viskositet mot konsentrasjon ved hjelp av sammenhengen $k'=a/b^2$ hvor b = likningens konstantledd og a =stigningstallet (kap 2.4.1).

Molekylvekt ble beregnet ved Mark-Houwink-Sakurada likningen, $[\eta]=K \cdot M_w^\alpha$. To ulike varianter av likningen ble benyttet: $[\eta]=9,55 \cdot 10^{-2} \cdot M_w^{0,73}$ ml/g (Anger, H. og Berth, G. 1984) og $[\eta]=4,7 \cdot 10^{-5} \cdot M_w^1$ g/100 ml (Christensen, P. E. 1954).

4.10.2 Bestemmelse av hugginskonstanten i 5 mM fosfatbuffer pH 7

Det laget en fortynningsrekke for hver pektintype i 5mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2). Fortynningene som ble laget var de samme som ved molekylvektsbestemmelse (Tabell 4-2).

Målingene av utrenningstidene for 2 ml av fosfatbufferen og pektinløsningene og beregninger av egenviskositet og hugginskonstant ble utført ved samme metode som beskrevet for bestemmelse av molekylvekt (kap 4.10.1).

4.11 Multivariat dataanalyse

Ved multivariat dataanalyse av faktorforsøk i del 2 av oppgaven (kap 5.2.1, 5.2.2 og 5.2.3) ble analysene utført med programvaren The Unscrambler versjon 9,7 (CAMO). Prøver som skilte seg ut som uteliggere i influenceplott, scoreplott og plott av predikert mot målt verdi ble fjernet før endelig modell ble laget.

Ved modellering med PLS-1 og PCA ble variablene og responsene vektet med $1/SDev$ og modellene ble validert med full kryssvalidering. Ved PLS-1 ble faktorer og samspill som ikke var signifikante ved jack knife testing ($p>0,05$) fjernet. Ved modellering med MLR ble faktorer som ikke var signifikante ($p>0,05$) fjernet og modellene validert med full kryssvalidering.

5. Forsøksoppsett

Det foreligger få tidligere studier for dekking av liposomer med pektin, og disse er av begrenset omfang. Del 1 av oppgaven ble derfor brukt til verifisering av dekkingen og undersøkelse av metodens reproduserbarhet.

I del 2 ble prosess- og formuleringsfaktorers betydning for produktets egenskaper undersøkt, basert på forsøk der positive liposomer ble dekket LM-pektin. Det ble satt opp to screeningforsøk, et fullfaktorielt og et redusert faktorforsøk. Deretter ble det satt opp ett optimaliseringsforsøk. Det ble så gjort en kort vurdering av faktorforsøkenes relevans for dekking av liposomer med HM-pektin og amidert pektin.

Del 3 av oppgaven var en stabilitetsstudie der pektindekkede liposomer med ulike egenskaper (partikkelstørrelse og pektintype) ble observert over tid.

5.1 Del 1: Verifisering av dekkingen og reproduserbarhet av metoden

5.1.1 Innledende forsøk

Positive og negative liposomer ble innledningsvis forsøkt dekket med 0,2 %(w/w) løsninger av HM-, LM- og amidert pektin. Forsøkene ble utført med betingelser som oppgitt i Tabell 5-1.

Tabell 5-1: Prosess- og formuleringsbetingelser i de innledende forsøkene for dekking av liposomer med pektin. Dekkingen ble utført med LM-, HM- og amidert pektin.

Liposomsammensetninger:	DPPC med 10 mol% DPTAP, 3 mM og DPPC med 10 mol% DPPG, 3 mM
Produksjonsmedium:	5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2)
Pektinkonsentrasjon:	0,2 %(w/w)
Tilsetningshastighet:	38 rpm (\approx 5,5 ml/min)
Tilsetningsrekkefølge:	Liposomer til pektinløsning

De pektindekkede liposomene ble observert visuelt ved produksjonen. Målinger av partikkelstørrelse og zetapotensiale ble utført for liposomsuspensjonene før dekking med pektin og for de pektindekkede liposomene en dag etter dekking.

5.1.2 Verifisering av dekkingen

Partikkelstørrelse og zetapotensiale

Zetapotensiale og partikkelstørrelse for 0,005-0,2 %(w/w) løsninger av LM-, HM- og amidert pektin ble målt ved flere fortynninger. Zetapotensialene målt for pektinløsningene ble sammenliknet med zetapotensialene til negative og positive liposomer dekket av pektin. Partikkelstørrelsene til pektin i løsningene ble sammenliket med partikkelstørrelsene til positive liposomer dekket av pektin. Liposomene som ble benyttet i forsøkene var 3 mM DPPC med 10 mol% av enten DPTAP (positive) eller DPPG (negative). Tabell 5-2 oppsummerer ved hvilke

fortynninger zetapotensiale og partikkelstørrelse ble målt for de forskjellige pektinløsningene og pektindekkede liposomene.

Tabell 5-2: Målinger av zetapotensiale og partikkelstørrelse for pektin i løsninger av HM-, LM- og amidert pektin, samt positive og negative liposomer (3 mM, DPPC + 10 mol% DPTAP eller DPPG) dekket med pektin. X=Utført måling

	Zetapotensiale*			Partikkelstørrelse**	
	Ufortynnet	Lite fortynnet	Mye fortynnet	Ufortynnet	Fortynnet
<i>Pektinløsninger (w/w %)</i>					
LM-pektin 0,05 %	-----	X	X	X	X
LM-pektin 0,2 %	X	X	-----	X	-----
HM-pektin 0,005 %	X	-----	-----	X	-----
HM-pektin 0,05 %	X	X	-----	X	X
HM-pektin 0,2 %	-----	X	X	X	X
Amidert pektin 0,005 %	X	-----	-----	X	-----
Amidert pektin 0,05 %	X	X	X	X	X
Amidert pektin 0,2 %	-----	X	X	X	X
<i>Positive liposomer dekket med:</i>					
LM-pektin 0,05 %	-----	X	-----	-----	X
LM-pektin 0,2 %	-----	X	-----	-----	X
HM-pektin 0,005 %	-----	X	-----	-----	X
HM-pektin 0,05 %	-----	X	-----	-----	X
HM-pektin 0,2 %	-----	X	X	-----	X
Amidert pektin 0,005 %	-----	X	-----	-----	
Amidert pektin 0,2 %	-----	X	X	-----	X
<i>Negative liposomer dekket med:</i>					
LM-pektin 0,2 %	-----	X	X	-----	-----
HM-pektin 0,2 %	-----	X	X	-----	-----
Amidert pektin 0,2 %	-----	X	X	-----	-----

*Lite fortynnet: 200-400 µl: 3 ml buffer. Mye fortynnet: 30µl: 3 ml buffer **Fortynnet: 25 µl: 2 ml buffer for liposomene og 125 µl: 2 ml for de pektindekkede liposomene.

Vasking av de pektindekkede liposomene ved ultrasentrifugering

Overskuddet av pektin ble fjernet ved å ultrasentrifugere pektindekkede positive liposomer flere ganger. Deretter ble partikkelstørrelse og zetapotensiale målt igjen.

Forforsøk for å finne egnede sentrifugeringsbetingelser

For positive liposomer dekket med 1 %(w/w) LM-pektin ble hastighetene 35 000, 40 000 og 45 000 rpm forsøkt ved sentrifugering 2*1 time, 4 °C. Partikkelstørrelse og

zetapotensiale ble målt før og etter ultrasenterifugering og for supernantantene ble det gjort turbiditetsmålinger.

For positive liposomer dekket med 0,2 %(w/w) HM- og amidert pektin ga senterifugering ved 35 000 rpm, 4°C pellet i kontrollrørene med kun pektinløsning. I flere forforsøk ble derfor ulike tiltak for å hindre dette forsøkt: Reduksjon av hastighet, reduksjon av pektinkonsentrasjon og økning av temperatur ved sentrifugeringen.

Ultrasenterifugering av pektindekkede liposomer

Positive liposomer (3 mM, DPPC med 10 mol% DPTAP) dekket med 0,05 %(w/w) HM-, LM- og amidert pektin, samt kontrollrør med bare pektinløsning, ble vasket ved ultrasenterifugering. Tabell 5-3 oppsummerer senterifugeringsprosessene. Zetapotensiale og partikkelstørrelse for de pektindekkede liposomene ble målt før og etter vaskeprosessen.

Tabell 5-3: Oversikt over senterifugeprosessene for liposomer (3mM, DPPC med 10 mol% DPTAP) dekket med 0,05 %(w/w) pektinløsninger.

Pektindekkede liposomer	Fortynning i senterifugerør	Senterifugehastighet (rpm), tid	T (°C)
LM-pektin	4 ml: 1 ml buffer	35 000, 2*1 time	4
HM-pektin	500 µl : 4,5 ml buffer	17 000, 1 time. 16 000, 1 time	20
Amidert pektin	500 µl : 4,5 ml buffer	17 000, 1 time. 16 000, 1 time	20

5.1.3 Reproduserbarhet av dekkingen

Det ble utført et dekkingsforsøk der alle prosess- og formuleringsfaktorer med unntak av tilsetningshastighet ble holdt på konstante nivåer. Disse nivåene er angitt i Tabell 5-4. For tilsetningshastighet ble et høyt nivå (38 rpm tilsvarende 5,5 ml/min) og et lavt nivå (7 rpm tilsvarende 1,2 ml/min) benyttet. Det ble produsert 4 replikater ved hver tilsetningshastighet.

Tabell 5-4: Prosess- og formuleringsbetingelser ved undersøkelse av metodens reproduserbarhet ved to tilsetningshastigheter.

Pektintype:	Lavmetoksyliert (LM)
Pektinkonsentrasjon:	0,05 % (w/w)
Liposomer:	DPPC med 10 mol% DPTAP, 3mM
Produksjonsmedium:	5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2)
Rekkefølge ved tilsetning:	Liposomer dryppes til pektin
Tilsetningshastighet:	38 RPM ($\approx 5,5$ ml/min) og 7 RPM ($\approx 1,2$ ml/min)

Partikkelstørrelser og zetapotensiale for liposomene og pektinløsningen ble målt før dekking og for de pektindekkede liposomene én dag etter dekking. De pektindekkede liposomene ble vasket ved ultrasenterifugering. Hele batchvolumet ble overført til senterifugerør og fortynnet til 5 ml med 5 mM fosfatbuffer, pH 7. Prøvene ble så ultrasenterifugert ved 35 000 rpm i 2*1 time ved 4 °C. Partikkelstrørrelse og zetapotensiale ble målt på resuspendert pellet.

5.2 DEL 2: Undersøkelse av utvalgte prosess- og formuleringsfaktorerens betydning for produktets egenskaper

I faktorforsøkene i del 2 av oppgaven ble LM-pektin anvendt som polymer for dekking av liposomer. Enkelte undersøkelser for de to andre pektintypene ble gjort i forlengelse av faktorforsøkene.

5.2.1 Fasetilstand for lipidene, pektinkonsentrasjon og tilsetningsrekkefølge; 2³-design

Effekten på produktet ved dekking av positive liposomer med LM-pektin ble undersøkt for tre faktorer: 1) Tilsetningsrekkefølge ved produksjon, 2) pektinkonsentrasjonen og 3) fasetilstand for lipidene i liposomsuspensjon. Faktorene ble undersøkt i et faktorforsøk på to nivåer (Tabell 5-5). For å lage gelfaseliposomer ble DPPC anvendt som hovedlipid og DPTAP som ladningsgivende molekyl. For å lage flytendefaseliposomer ble egg-PC anvendt som hovedlipid og DOTAP som

ladningsgivende molekyl. Forsøket var et screeningforsøk, designet som et fullfaktorforsøk, 2^3 , uten senterpunkter.

Tabell 5-5: Oversikt over faktorene undersøkt i 2^3 fullfaktorforsøk for dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Faktor	Forkortelse	Nivå
Pektinkonsentrasjon (%w/w)	Pek-k	0,2
Fasetilstand for lipidene (lavt, høyt)	Lipid	Gel (DPPC, DPTAP)
Tilsetningsrekkefølge (lavt, høyt)	Til-rekk	Lip→pek * Pek→lip**

* Lip→pek = Liposomer dryppes til pektinløsning. ** Pek→lip = pektinløsning dryppes til liposomene.

Betingelsene for de konstante prosess- og formuleringsfaktorene i forsøket er oppsummert i Tabell 5-6.

Tabell 5-6: Konstante prosess- og formuleringsfaktorer for 2^3 fullfaktorforsøk for dekking av positive liposomer med pektin.

Lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonen:	3 mM
Mengde ladet lipid:	10 mol%
Pektintype:	LM-pektin
Hydreringsmedium:	5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2)
Tilsetningshastighet:	38 rpm (≈5,5ml/min)

Forsøksoppsettet med matriser for behandlingskombinasjonene er vist i Tabell 5-7.

Designet ble satt opp manuelt.

Tabell 5-7: Matriser for behandlingskombinasjonene i 2^3 fullfaktorielt forsøk for screening av tre prosess- og formuleringsfaktorer ved dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Designprøve	Pektinkons. (w/w %)	Fasetilstand	Tilsetningsrekkefølge*
1	0,2	Gel	Lip→pek
2	1	Gel	Lip→pek
3	0,2	Flytende	Lip→pek
4	1	Flytende	Lip→pek
5	0,2	Gel	Pek→lip
6	1	Gel	Pek→lip
7	0,2	Flytende	Pek→lip
8	1	Flytende	Pek→lip

* Lip→pek = Liposomer dryppes til pektinløsning, pek→lip= pektinløsning dryppes til liposomene.

Responsvariablene som ble studert var:

- Zetapotensiale for de pektindekkede liposomene.
- Endring i partikkelstørrelse ved dekking = partikkelstørrelse for pektindekkede liposomer – partikkelstørrelse for liposomer.

Målinger av partikkelstørrelse og zetapotensiale ble utført for utgangsløsningene før dekking og for de pektindekkede liposomene en dag etter dekking. Turbiditeten til alle prøvene og utgangsløsningene ble målt, for å vurdere om turbiditetsendring kunne brukes som et raskere mål på størrelsesendringen ved dekkingen.

På bakgrunn av foranalyser ble prøver som skilte seg ut som uteliggere med stor betydning på responsene fjernet, og det ble gjort en PLS-1 analyse av faktorenes betydning for hver respons.

5.2.2 Lipidkonsentrasjon, mengde ladet lipid, tilsetningshastighet og pektinkonsentrasjon; 2^{4-1} -design

Det ble satt opp et redusert faktorforsøk for å avdekke flere faktorer av betydning for produktet ved dekking av positive liposomer med LM-pektin. Prosess- og formuleringsfaktorene som ble studert var: 1) Lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonene, 2) Mengde ladet lipid i liposomsuspensjonen, 3) Tilsetningshastighet av liposomsuspensjon til pektinløsningene og 4) Konsentrasjon av pektinløsningen. Forsøket var et screeningforsøk, designet som et 2^{4-1} redusert faktorforsøk. Det ble i tillegg utført 3 replikater av senterpunktet. Nivåene av faktorene er oppgitt i Tabell 5-8.

Tabell 5-8 : Nivåene av faktorene i 2^{4-1} redusert faktorforsøk for dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Faktor	Forkortelse	Nivå	
Lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonen (mmol/L)	Lip-k	3	10
Mengde ladet lipid (mol%)	Ladn	2	10
Tilsetningshastighet av liposomer til pektinløsningen (rpm)	TH	7	38
Pektinkonsentrasjon (%w/w)	Pek-k	0,05	0,2

De konstante prosess- og formuleringsfaktorene under dekkingen er gjengitt i Tabell 5-9.

Tabell 5-9: Konstante prosess- og formuleringsfaktorer i 2^{4-1} redusert faktorforsøk for dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Liposomsammensetning:	DPPC med DPTAP
Pektintype:	LM-pektin
Tilsetningsrekkefølge ved produksjon:	Liposomer til pektin
Produksjonsmedium:	5 mM fosfatbuffer pH 7 (kap 3.2.2)

Matrisene med de ulike behandlingskombinasjonene ble satt opp ved hjelp av The Unscrambler versjon 9,7 (CAMO). Disse er gjengitt i Tabell 5-10.

Tabell 5-10: Matriser for behandlingskombinasjonene i 2^{4-1} redusert faktorforsøk for screening av fire prosess- og formuleringsfaktorer ved dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Designprøve	Lipid-konsentrasjon (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Tilsetnings-hastighet (rpm)	Pektin-konsentrasjon (w/w %)
1a	3	2	7	0,05
2a	10	2	7	0,2
3a	3	10	7	0,2
4a	10	10	7	0,05
5a	3	2	38	0,2
6a	10	2	38	0,05
7a	3	10	38	0,05
8a	10	10	38	0,2
cent-a	6,5	6	22,5	0,125
cent-b	6,5	6	22,5	0,125
cent-c	6,5	6	22,5	0,125

Forsøket ble utført etter en randomisert forsøksplan, generert ved hjelp av The Unscrambler versjon 9,7 (CAMO).

Responsvariablene som ble studert var:

- Zetapotensiale for de pektindekkede liposomene.
- Endring i partikkelstørrelse ved dekking.
- Polydispersitetsindeks ved partikkelstørrelsesmåling.

Målinger av partikkelstørrelse og zetapotensiale ble utført for utgangsløsningene før dekking og for de pektindekkede liposomene en dag etter dekking.

På bakgrunn av foranalyse ble prøver definert som uteliggere med stor påvirkning på responsene fjernet. Sammenhengen mellom de tre responsvariablene ble studert ved hjelp av PCA og modeller for faktorenes betydning på størrelsesendring og zetapotensiale ble laget ved hjelp av PLS-1.

5.2.3 Optimalisering av formuleringen; central composite design.

Det ble utarbeidet et optimaliseringsdesign for dekking av positive liposomer med LM-pektin, hvor tre formuleringsfaktorer som ble funnet betydningsfulle i screeningforsøkene ble undersøkt på tre nivåer. Faktorene som ble undersøkt var:

- 1) Lipidkonsentrasjonen i liposomsuspensjonen, 2) Mengde ladet lipid og
- 3) Pektinkonsentrasjonen. Designet var et central composite design.

Forforsøk til optimaliseringsdesign

I det reduserte faktorforsøket (2^{4+1} -designet, kap 5.2.2) oppstod det problem med aggregering for kombinasjonen høy lipidkonsentrasjon, høy tilsetningshastighet, lav pektinkonsentrasjon og lav mengde ladet lipid. Det ble derfor utført to forforsøk for å finne faktorkombinasjoner som ikke medførte aggregererte prøver i dette hjørnet av forsøksrommet.

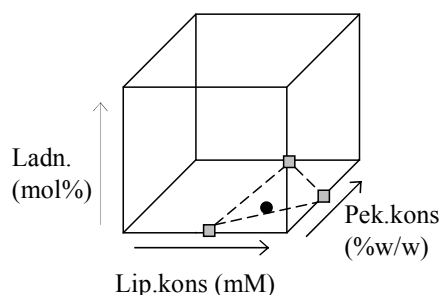
Forforsøk 1

Det ble produsert pektindekkede liposomer med lik sammensetning som det aggregerte forsøkshjørnet fra det reduserte faktorforsøket, men med tilsetningshastighet redusert til lavt nivå, 7 rpm. Pektinkonsentrasjonen og mengde ladet lipid ble holdt på sine lave nivåer og lipidkonsentrasjonen på høyt nivå (Tabell 5-8). De øvrige betingelsene for dekkingen var som Tabell 5-9 viser.

Forforsøk 2

Det ble undersøkt to tilnærminger for å begrense forsøksrommet, slik at hjørnet med lav pektinkonsentrasjon, lav mengde ladet lipid og høy lipidkonsentrasjon kunne unngås.

- a) Det ble produsert tre forsøkspunkter som markerte grensene for det hjørnet av forsøksrommet som skulle unngås. Hvert punkt lå midt på aksene for hver variabel og fikk middleverdi av denne variabelen (0) og ytterverdi av de to andre (-1 eller 1). Punktene ble således hjørnepunkt i en tenkt trekant inne i forsøksrommet, som Figur 5-1 viser.
- b) I tilnærmingen under a) ble et stort volum av det opprinnelige forsøksrommet ikke undersøkt. Trekanten som begrenset området ble derfor tenkt flyttet til å ligge på aksene ved $\frac{3}{4}$ av maksimal lipidkonsentrasjon og på aksene ved $\frac{1}{4}$ av maksimal mengde ladet lipid og pektinkonsentrasjon. Da disse tre punktene ville ligget nært hverandre, ble det besluttet å heller undersøke punktet midt på flaten av denne trekanten: Punktet med $\frac{3}{4}$ av maksimal lipidkonsentrasjon og $\frac{1}{4}$ av maksimal ladningsprosent og pektinkonsentrasjon (Figur 5-1). Dette punktet fikk kombinasjonen $\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$, i motsetning til ytterpunktet 1,-1,-1.



Figur 5-1: Forforsøk for optimalisering av dekkingsprosessen. □ = forsøkspunktene i forforsøk 2 a) og ● = Forsøkspunktet i forforsøk 2 b).

Alternativene a) og b) ble undersøkt i et forforsøk der tilsetningshastgheten ble holdt konstant på 7 rpm og forsøket forøvrig ble utført med konstante prosess- og formuleringsfaktorer som i 2^{4-1} -designet (Tabell 5-9). Punktene som ble undersøkt i forforsøket er oppsummert i Tabell 5-11.

Tabell 5-11: Matriser for behandlingskombinasjonene i forforsøk 2 til optimaliseringsdesign for dekking av positive liposomer med LM-pektin. -1, 0 og 1 representerer henholdsvis lavt, middels og høyt nivå av faktorene.

Kombinasjon	Forforsøk	Lipidkonsentrasjon (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Pektinkonsentrasjon (w/w %)
0, -1, -1	2 a)	6,5	2	0,05
1, 0, -1	2 a)	10	6	0,2
1, -1, 0	2 a)	10	2	0,125
$\frac{1}{2}$, $-\frac{1}{2}$, $-\frac{1}{2}$ *	2 b)	8,25	4	0,0875

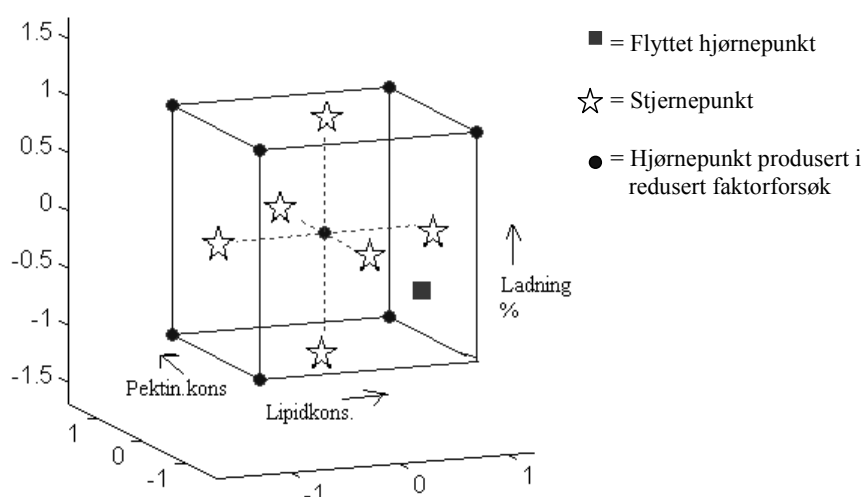
*Kombinasjonen er oppgitt relativt til høyt nivå (1) og lavt nivå (-1).

Partikkelstørrelse og zetapotensiale ble målt for liposomer før dekking og etter henstand over natt for pektindekkede liposomer. De pektindekkede liposomene ble observert visuelt for eventuelt synlig aggregering ved produksjon eller sedimentering i hetteglassene over natt.

Optimaliseringsdesign for dekking av liposomer med pektin: Trenivås-central composite design med multineær begrensning.

For å utvikle modeller for zetapotensiale og endring i partikkelstørrelse som funksjon av lipidkonsentrasjonen, mengde ladet lipid og pektinkonsentrasjonen, ble det laget et central composite design. Stjernepunktene ble forskjøvet inn til flatene i kuben som forsøksrommet til de tre faktorene utgjorde.

Forsøket var en utvidelse av det reduserte faktorforsøket (2^{4-1} -design, se kap 5.2.2) for dekking av positive liposomer med LM-pektin. De 8 produserte designpunktene utgjorde nå hjørnepunktene i et fullfaktorielt forsøk for de tre valgte formuleringsfaktorene. Utvidelsen ble gjort ved å komplettere designet med 6 stjernepunkter, ett på hver flate av kubens, samt et flyttet hjørnepunkt med 8,25 mM lipidkonsentrasjon, 4 mol% ladning og 0,0875 % (w/w) LM-pektin (Figur 5-2). Det flyttede hjørnepunktet ble valgt på bakgrunn av forforsøkene til optimaliseringsdesignet. Tilsetningshastigheten ble holdt konstant på sitt lave nivå, 7 rpm.



Figur 5-2: Oversikt over forsøkspunktene i central compositedesignet for optimalisering av formuleringen.

Senterpunktet ble repetert tre ganger for å ha kontroll på variasjonen som følge av at hjørnepunktene og stjernepunktene ble produsert på ulike tidspunkt med ulike tilsetningshastigheter.

Tabell 5-12: Nivåene av faktorene i central compositedesignet for dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Faktor	Forkortelse	Nivå		
Lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonen (mmol/L)	Lip-k	3	6,5	10
Mengde ladet lipid (mol%)	Ladn	2	6	10
Pektinkonsentrasjon (%w/w)	Pek-k	0,05	0,125	0,2

Nivåene av de undersøkte faktorene er gjengitt i Tabell 5-12. Matrisene for central composite designet ble satt opp ved hjelp av The Unscrambler versjon 9,7 og er oppgitt i Tabell 5-13. Prøvene 1a-8a er prøver fra det reduserte faktorforsøket. De resterende prøvene ble utført i randomisert sekvens, generert av The Unscrambler.

Tabell 5-13: Matrisene for behandlingskombinasjonene i central compositedesignet for dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Designprøve	Lipidkonsentrasjon (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Pektinkonsentrasjon (w/w%)
1a	3	2	0,05
2a	10	2	0,2
3a	3	10	0,2
4a	10	10	0,05
5a	3	2	0,2
7a	3	10	0,05
6a-ny	8,25	4	0,0875
8a	10	10	0,2
*1	3	6	0,125
*2	10	6	0,125
*3	6,5	2	0,125
*4	6,5	10	0,125
*5	6,5	6	0,05
*6	6,5	6	0,2
cent-1	6,5	6	0,125
cent-2	6,5	6	0,125
cent-3	6,5	6	0,125

Som i det reduserte faktorforsøket, ble dekking med LM-pektin utført på positive liposomer med DPPC som hovedlipid og DPTAP som ladningsgivende molekyl, hydrert i 5 mM fosfatbuffer, pH 7 (kap 3.2.2). Liposomer ble dryppet til pektinløsningen med tilsetningshastighet 7 rpm ($\approx 1,2$ ml/min).

Responsvariablene som ble studert var:

- Zetapotensiale for de pektindekkede liposomene.
- Endring i partikkelstørrelse ved dekking

Målinger av partikkelstørrelse og zetapotensiale ble utført for utgangsløsningene før dekking og for de pektindekkede liposomene en dag etter dekking. De pektindekkede

liposomene ble observert visuelt for eventuell synlig aggregering ved produksjon eller sedimentering i hetteglass over natt.

På bakgrunn av foranalyse ble prøver identifisert som uteliggere med stor påvirkning på størrelsesendringen fjernet, og det ble laget modell for faktorenes betydning på størrelsesendringen ved hjelp av PLS-1. For faktorenes betydning på zetapotensialet ble det laget modell både med PLS-1 og MLR.

5.2.4 Faktorforsøkernes relevans for dekking av liposomer med amidert pektin og HM pektin

I etterkant av faktorforsøkene ble enkelte forsøkspunkt undersøkt med HM-pektin og amidert pektin som dekkingspolymer. Punktene som ble undersøkt var punktet som aggregerte i det reduserte faktorforsøket (2^{4-1} -designet, kap 5.2.2), samt senterpunktet og det flyttede hjørnepunktet fra optimaliseringsdesignet. Tabell 5-14 viser de repeterte punktene. De resterende konstante prosess- og formuleringsfaktorer ble beholdt som i det reduserte faktorforsøket (Tabell 5-9).

Tabell 5-14: Behandlingskombinasjoner for undersøkelse av faktorforsøkernes relevans ved dekking av positive liposomer med amidert pektin og HM-pektin.

Prøve	Lipid-konsentrasjon (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Tilsetnings-hastighet (rpm)	Pektin-konsentrasjon (w/w %)	Pektin-Type
HM-aggr.	10	2	38	0,05	HM-pektin
Am-aggr.	10	2	38	0,05	Amider pektin
HM- cent	6,5	6	7	0,125	HM-pektin
Am-cent	6,5	6	7	0,125	Amider pektin
HM- flyttet	8,25	4	7	0,0875	HM-pektin
Am-flyttet	8,25	4	7	0,0875	Amider pektin

Partikkelstørrelse og zetapotensiale ble målt på utgangsløsningene før dekking og på de pektindekkede liposomene en dag etter dekking. De pektindekkede liposomene ble observert visuelt for eventuell synlig aggregering ved produksjon eller sedimentering i hetteglass over natt.

5.3 Del 3: Stabilitetsstudie av pektindekkede liposomer.

Positive liposomer dekket med HM-pektin, amidert pektin og LM-pektin ble produsert for kontroll av stabilitet over en periode på 12 uker. For hver pektintype ble det produsert to ulike formuleringer av pektindekkede liposomer. Formuleringene hadde ulik pektinkonsentrasjon og lipidkonsentrasjon, slik Tabell 5-15 viser.

Tabell 5-15: Lipidkonsentrasjon og pektinkonsentrasjon for de to ulike formuleringene av pektindekkede liposomer i stabilitetsstudien.

Formuleringsfaktor	Formulering 1	Formulering 2
Lipidkonsentrasjon (mM)	10	3
Pektinkonsentrasjon (w/w %)	0,125	0,05

Øvrige prosess- og formuleringsfaktorer ble holdt konstante, som vist i Tabell 5-16. For hver formulering ble det produsert tre paralleller. Til sammen for de tre pektintypene utgjorde dette 18 batcher. Under studieperioden ble alle batchene av de pektindekkede liposomene lagret i kjøleskap.

Tabell 5-16: Konstante prosess- og formuleringsfaktorer for stabilitetsstudie av pektindekkede liposomer

Liposomsammensetning:	DPPC med DPTAP
Mengde ladet lipid:	10 mol%
Tilsetningsrekkefølge:	Liposomer → pektin
Tilsetningshastighet:	20 rpm (\approx 2,9 ml/min)
Produksjonsmedie:	5 mM fosfatbuffer, pH 7 (kap 3.2.2)

Stabiliteten til de pektindekkede liposomene ble fulgt opp ved:

1. Måling av partikkelstørrelse en dag etter produksjon, ukentlig i tre uker, så intermitterende inntil 12 uker etter produksjon.
2. Måling av zetapotensiale en dag etter produksjon, ukentlig i tre uker, så intermitterende inntil 12 uker etter produksjon.
3. Måling av pH en dag etter produksjon samt intermitterende inntil 12 uker etter produksjon.
4. Observasjon av eventuelle synlige endringer og sedimentering i hetteglass daglig i 4 uker, deretter intermitterende inntil 12 uker etter produksjon.

Partikkelstørrelse og zetapotensiale for de positive liposomene ble målt en dag etter de ble produsert og intermitterende inntil 12 uker etter produksjon.

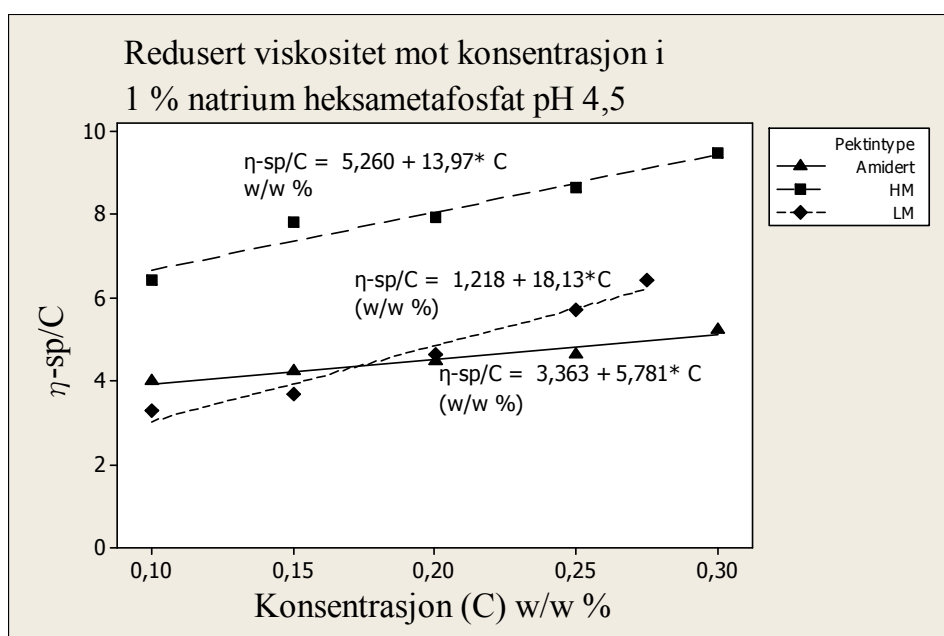
Pektinløsningenes pH ble målt på dagen for dekkingen og etter 3, 8 og 12 uker. Zetapotensiale ble målt etter 3, 8 og 12 uker, da ved samme fortykning før måling som de pektindekkede liposomene.

6. Resultater

6.1 Karakterisering av pektin

6.1.1 Bestemmelse av molekylvekt

Den reduserte viskositeten, η_{sp}/C , i 1 % natrium heksametafosfat pH 4,5 er plottet mot pektinkonsentrasjonen for hver pektintype i Figur 6-1.



Figur 6-1: Redusert viskositet mot konsentrasjon for løsninger av amidert pektin, HM-pektin og LM-pektin i 1% natrium heksametafosfat pH 4,5.

Tabell 6-1 oppsummerer egneviskositet (dl/g), molekylvekt (g/mol), og hugginskonstanten i 1% natrium heksametafosfat pH 4,5 for hver pektintype. Benevnelsen dl/g forutsetter at 100 g = 100 ml = 1 dl.

Tabell 6-1: Egenviskositet ($[\eta]$), molekylvekt (M_w) i g/mol beregnet ved to varianter av Mark-Houwink-Sakurada likningen, og hugginskonstanten (k') for LM-, HM- og amidert pektin i 1% ($(\text{NaPO}_3)_6$) pH 4,5.

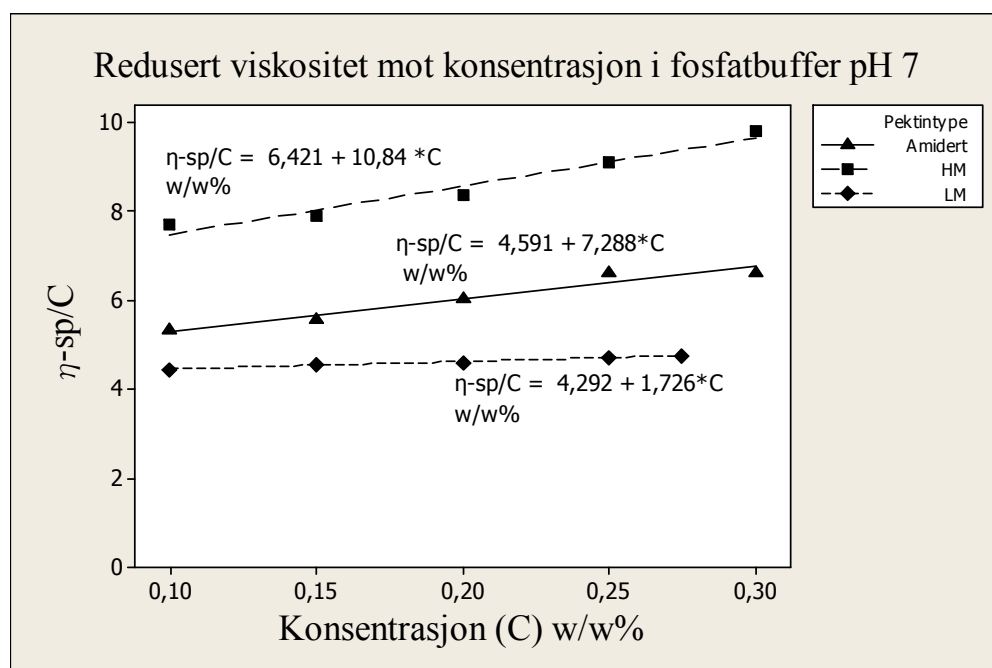
Pektintype	$[\eta]$ (dl/g)	$M_w^a)$	$M_w^b)$	k'	r^{2*}
LM-pektin	1,2	$\approx 1,8 \cdot 10^4$	$\approx 2,6 \cdot 10^4$	12,22	0,967
HM-pektin	5,3	$\approx 1,3 \cdot 10^5$	$\approx 1,1 \cdot 10^5$	0,51	0,945
Amidert pektin	3,4	$\approx 7,2 \cdot 10^4$	$\approx 7,1 \cdot 10^4$	0,51	0,943

* r^2 for regresjonen av η_{sp}/C mot C , a) Beregnet fra Anger og Berth (1984) b)

Beregnet fra Christensen (1954)

6.1.2 Bestemmelse av hugginskonstanten i 5 mM fosfatbuffer pH 7

Den reduserte viskositeten, η_{sp}/C , i 5 mM fosfatbuffer pH 7 er plottet mot konsentrasjonen for hver pektintype i Figur 6-2.



Figur 6-2: Figuren viser redusert viskositet mot konsentrasjon for løsninger av amidert pektin, HM-pektin og LM-pektin i 5 mM fosfatbuffer pH 7.

Tabell 6-2 oppsummerer egenviskositeten (g/dl) og hugginskonstanten for hver pektintype i fosfatbufferen. Benevnningen for egenviskositeten forsetter at 100 g = 100 ml = 1 dl.

Tabell 6-2: Egenviskositet ($[\eta]$) og hugginskonstant (k') for løsninger av LM-, HM- og amidert pektin i 5 mM fosfatbuffer pH 7.

Pektintype	$[\eta]$ (dl/g)	k'	r^{2*}
LM-pektin	4,3	0,094	0,982
HM-pektin	6,4	0,263	0,958
Amidert pektin	4,6	0,346	0,937

* r^2 for regresjonen av η_{sp}/C mot C .

6.2 Del 1: Verifisering av dekkingen og reproduserbarhet av metoden.

6.2.1 Innledende forsøk

I de innledende forsøkene ble både positive og negative liposomer forsøkt dekket med LM-pektin, HM-pektin og amidert pektin. Det ble gjort én dekking av positive og én av negative liposomer med hver pektintype.

Det skjedde ingen umiddelbar synlig aggregering når liposomene ble dryppet til pektin. Videre var det ingen synlige endringer i suspensjonene etter henstand i kjøleskap over natt. Partikkelstørrelse og zetapotensiale for positive liposomer og pektindekkede positive liposomer er vist i Tabell 6-3.

Tabell 6-3: Partikkelstørrelse (str.), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensiale (zeta) for positive liposomer (3 mM, DPPC + 10 mol% DPTAP) og pektindekkede positive liposomer. Pektinløsningene benyttet var 0,2 % (w/w).

Preparat	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)
<i>Dekking med LM-pektin</i>			
Positive liposomer	166	0,12	26,5
Pektindekkede liposomer	289	0,263	-46,9
<i>Dekking med amidert pektin</i>			
Positive liposomer	135	0,105	27
Pektindekkede liposomer	269	0,403	-39,6
<i>Dekking med HM-pektin</i>			
Positive liposomer	135	0,105	27
Pektindekkede liposomer	397	0,663	-27

Partikkelstørrelse og zetapotensiale for negative liposomer og pektindekkede negative liposomer er vist i Tabell 6-4.

Tabell 6-4: Partikkelstørrelse (str.), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensiale (zeta) for negative liposomer (3 mM, DPPC + 10 mol% DPPG) og pektindekkede negative liposomer. Pektinløsningene benyttet var 0,2 %(w/w)

Preparat	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)
Negative liposomer	153	0,092	-49,5
"Pektindekkede" negative liposomer, LM-pektin	155	0,118	-37,7
"Pektindekkede" negative liposomer, amidert pektin	175	0,253	-30,4
"Pektindekkede" negative liposomer, HM-pektin	176	0,226	-27

6.2.2 Verifisering av dekkingen

Zetapotensiale

I Tabell 6-5 vises zetapotensiale for 0,2 %(w/w) pektinløsninger og liposomer dekket med disse løsningene. Zetapotensiale for pektinløsningene ufortynnet eller ved lite fortynning lå i området -41 til -44 mV for amidert pektin og LM-pektin og på ca -27 mV for HM-pektin. Ved mer fortynning før måling viste zetapotensialene til pektinløsningene en tendens til økt bredde i fordelingene og at grafene for zetapotensialet ble splittet opp i flere topper (Figur 6-4 a og b, Figur 6-5 a og b og Figur 6-6 a og b). Tilsvarende hadde positive liposomer dekket med LM-pektin og amidert pektin zetapotensiale i området -39 til -47 mV og positive liposomer dekket med HM-pektin zetapotensiale på -27 mV (Tabell 6-5). Zetapotensiale til de pektindekkede positive liposomene økte ikke i bredde og ble ikke splittet i flere topper på samme måte som pektinløsningene ved fortynning (Figur 6-4 c, Figur 6-5 c og Figur 6-6 c). Zetapotensialet til positive liposomer før dekking vises Figur 6-3.

For de negative liposomene var zetapotensialet etter dekking -30 til -40 mV.

Fordelingene var imidlertid brede, og bredden økte betraktelig ved fortynning før

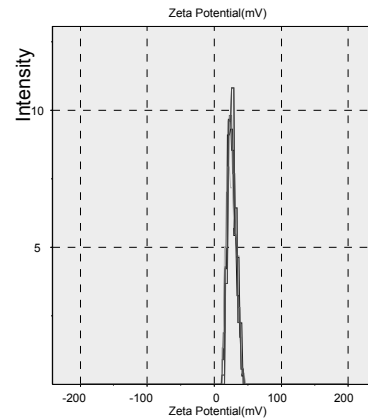
måling (Tabell 6-5). Zetapotensialegrafene for de pektindekkede negative liposomene viste oppsplitting i flere topper ved fortynning (Figur 6-7). Grafene liknet således grafene til pektinløsningene (Figur 6-4 b, Figur 6-5 b og Figur 6-6 b).

Trenden var den samme for de resterende undersøkte konsentrasjonsnivåene av pektinløsninger og pektindekkede positive liposomer. Zetapotensiale for alle målte løsninger og pektindekkede liposomer foreligger i vedlegg 1.

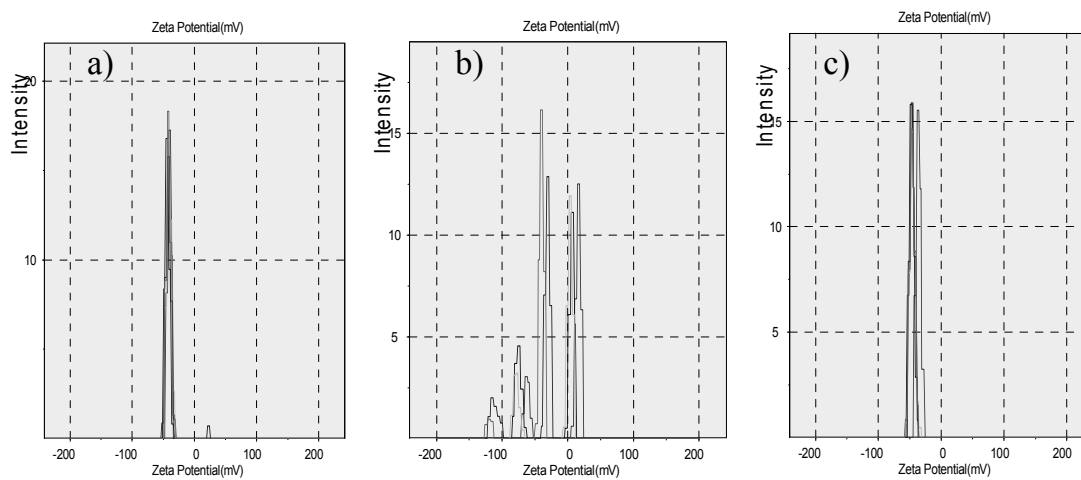
Tabell 6-5: Zetapotensiale til pektinløsninger og pektindekkede positive og negative liposomer (3 mM, DPPC + 10 mol% DPTAP eller DPPG) målt ved ulike fortynninger. Pektinløsninger er oppgitt i w/w-%.

Fortynning:	Ufortynnet		Lite fortynnet (200-400 µl: 3 ml)		Mye fortynnet (30 µl: 3 ml)	
Preparat	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width
<i>LM-pektin</i>						
LM-pektin 0,2 %	-41,2	3,9	-23,2	29,4		
Positive liposomer, dekket			-46,9	1,6		
Negative liposomer dekket			-37,7	28,8	-14,7	13,9**
<i>Amidert pektin</i>						
Amidert pektin 0,2 %			-43,5	1,6	-35,6	37,4
Positive liposomer, dekket			-39,6	1,6	-42,5	16,8*
Negative liposomer, dekket			-41,6	21,4	-32,8	33,5**
<i>HM-pektin</i>						
HM-pektin 0,2 %			-27,2	1,6	-23,2	28,2
Positive liposomer, dekket			-27	1,6	-27	4,3*
Negative liposomer dekket			-30,4	17	-25	31,3**

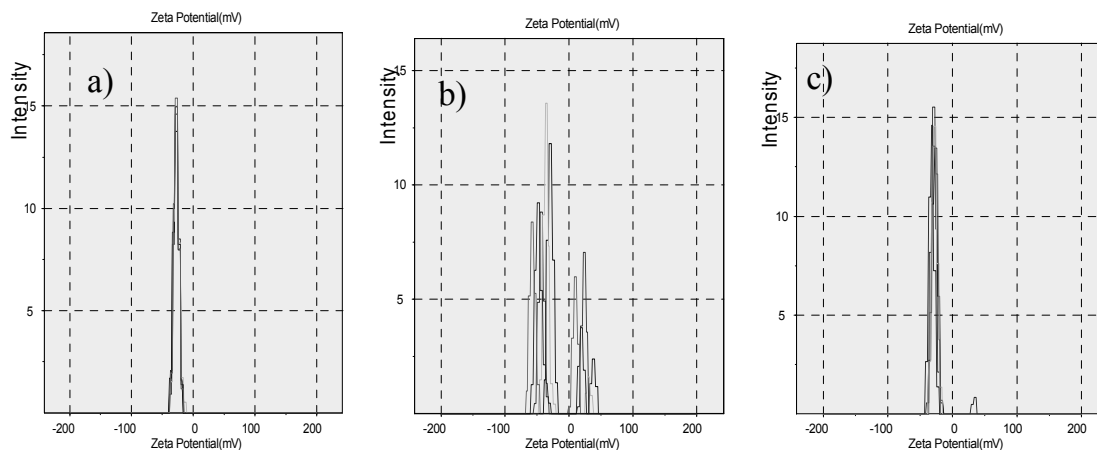
*Kun én topp eller én dominerende samling av topper. **Mange spredte topper



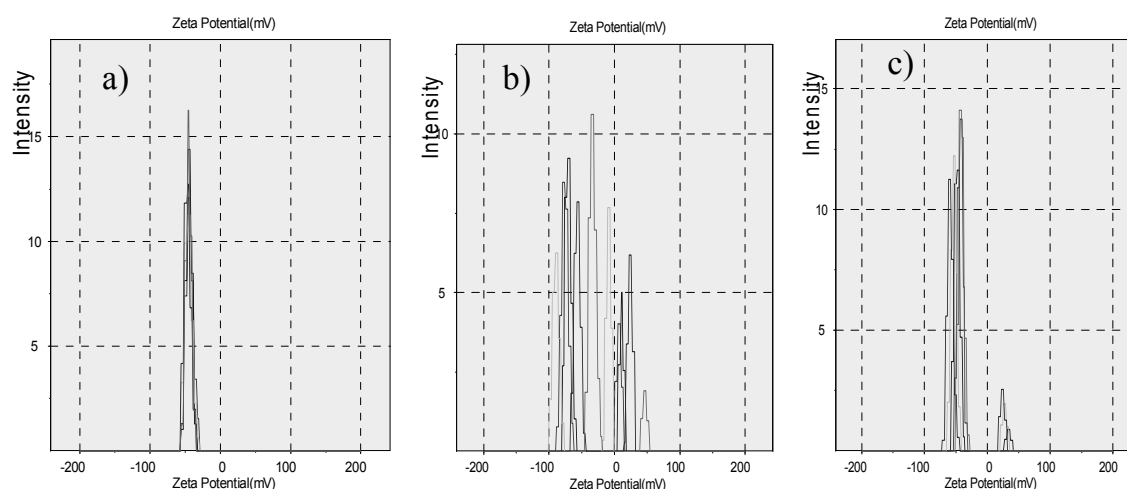
Figur 6-3: Zetapotensiale (mV) til positive liposomer (3mM, DPPC + 10% DPTAP)



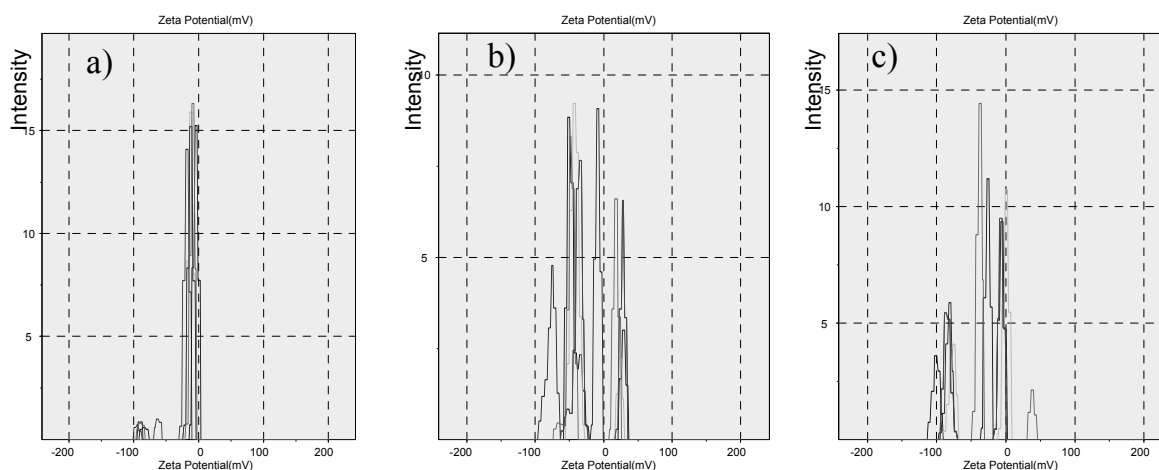
Figur 6-4: Zetapotensiale (mV) til a) LM-pektin 0,2 %(w/w) målt ufortynnet, b) LM-pektin 0,2 %(w/w) fortynnet 400 μ l : 3 ml buffer og c) positive liposomer dekket med 0,2 %(w/w) LM pektin, fortynnet 200 μ l : 3 ml buffer.



Figur 6-5: Zetapotensialet (mV) til a) 0,2 %(w/w) HM-pektin fortynnet 200 μ l : 3 ml buffer, b) 0,2% (w/w) HM-pektin fortynnet 30 μ l : 3 ml buffer og c) positive liposomer dekket med 0,2 %(w/w) HM-pektin fortynnet 30 μ l : 3 ml buffer.



Figur 6-6: Zetapotensialet (mV) til a) amidert pektin 0,2% (w/w) fortynnet 200 µl: 3 ml buffer, b) amidert pektin 0,2 % (w/w) fortynnet 30 µl: 3 ml buffer og c) positive liposomer dekket med amidert pektin fortynnet 30 µl: 3 ml buffer.



Figur 6-7: Zetapotensialet negative liposomer dekket med 0,2 % (w/w) a) LM-pektin, b) HM-pektin og c) amidert pektin. Målt ved fortynning 30 µl: 3 ml buffer.

Partikkelstørrelse

Partikkelstørrelse, polydispersitetsindeks og count rate for 0,2 % (w/w)

pektinløsninger og positive liposomer dekkede av de samme løsningene foreligger i Tabell 6-6. Tabellen viser at ufortynnede pektinløsninger hadde partikkelstørrelser på 500-1000 nm og polydispersitetsindeksen ved måling var mellom 0,77 og 1. For LM-pektin var count rate ufortynnet 70 KCps. For ufortynnet 0,2 % (w/w) amidert og HM-pektin var count rate høy (>300 KCps). Ved fortynning av prøvene før måling sank count rate til <30 KCps og målingene måtte avbrytes underveis på grunn av at count rate var utenfor det egnede området for PCS-metoden (50-500 KCps).

De pektindekkede positive liposomene hadde partikkelstørrelser på 250-400 nm og polydispersitetsindeks på 0,3-0,66. Positive liposomer dekket med 0,005 %(w/w) HM-pektin skilte seg ut fra de andre pektindekkede liposomene (Tabell 6-6).

Partikkelstørrelsen for disse var 934 nm og polydispersitetsindeksen 0,91.

I vedlegg 1 følger alle målinger av partikkelstørrelse til pektinløsninger og pektindekkede positive liposomer. Trenden med brede fordelinger og store partikkelstørrelser for ufortynnede løsninger var den samme for alle pektinløsningene.

Tabell 6-6: Partikkelstørrelse (str.) for pektinløsninger målt fortynnet og ufortynnet og positive liposomer (3 mM, 10 mol% DPTAP) dekket med pektinløsningene. Pektinløsninger er oppgitt i w/w%.

Fortynning:	Ufortynnet			Fortynnet*		
	Str. (nm)	PI	Count rate (Kcps)	Str. (nm)	PI	Count rate (KCps)
<i>Pektinløsninger</i>						
LM-pektin 0,2 %	520	0,912	67			
Amidert pektin 0,2 %	948	0,863	345	>1000	1	10 til 30
HM-pektin 0,2 %	636	0,885	Ikke notert	>1000	1	10 til 30
<i>Pektindekkede liposomer</i>						
Liposomer med 0,2 % LM- pektin				297	0,263	Ikke notert
Liposomer med 0,2 % amidert pektin				269	0,403	433
Liposomer med 0,2 % HM-pektin				397	0,663	447
Liposomer med 0,005 % HM-pektin				934	0,911	477

* Pektinløsningene ble målt ved fortynning 25 µl løsning: 2 ml buffer og pektindekkede liposomer ble målt ved fortynning 125 µl suspensjon: 2 ml buffer.

Vasking av pektindekkede liposomer ved ultrasentrifugering

Forforsøk for å finne egnede sentrifugeringsbetingelser

I forforsøket for ultrasentrifugering av LM-pektin og LM-pektindekkede positive liposomer sedimenterte de pektindekkede positive liposomene til pellet ved alle de anvendte hastighetene. Kontrollrørene med bare pektinløsning fikk ikke pellet. Det oppstod imidlertid problemer med resuspenderingen av pelletene ved senterifugehastighetene 40 000 rpm og 45 000 rpm. Supernatantenes turbiditet økte

når senterifugehastigheten ble redusert, samtidig som count rate ved størrelsesmåling sank. Kontrollrørene med pektin var ikke turbide.

Ved alle hastighetene forble produktets zetapotensiale negativt etter sentrifugeringen, og partikkelstørrelsen økte. Økningen i partikkelstørrelse ble større ved høyere senterifugehastigheter.

Etter flere forforsøk for ultrasenterifugering av HM-pektin og amidert pektin, ble det funnet at løsninger av 0,05 %(w/w) fortynnet 400 µl: 4,6 ml fosfatbuffer i sentrifugerørene ikke ga pellet ved senterifugering ved 17 000 rpm, 20 °C i 2*1 time.

Ultrasentrifugering av pektindekkede liposomer

Tabell 6-7 viser partikkelstørrelse, PI og zetapotensiale for pektindekkede positive liposomer før og etter vasking med ultrasentrifugering. Ved ultrasenterifugeringen økte partikkelstørrelsen for de pektindekkede liposomene 89, 64, og 30 nm for henholdsvis liposomer dekket med LM-pektin, amidert pektin og HM-pektin. Zetapotensialet endret seg ikke. Polydispersitetsindeksen ved størrelsesmåling sank for liposomer dekket med både amidert pektin og HM-pektin, henholdsvis med 0,236 og 0,333. For LM-pektin, derimot, økte polydispersitetsindeksen.

Tabell 6-7: Partikkelstørrelse (str.), polydispersitetsindeks (PI) og zetapotensiale (zeta) for positive liposomer (3mM, DPPC +10 mol% DPTAP) dekket med 0,05 % (w/w) pektinløsninger før og etter vasking med ultrasentrifugering.

	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)	Hastighet (rpm)	Temperatur
<i>Dekking med LM-pektin</i>					
Pektindekkede liposomer	210,2	0,215	-43,6	350000, 2*1 time	4 °C
Pektindekkede liposomer, ultrasentrifugert	298,9	0,304	-43,7		
<i>Dekking med amidert pektin</i>					
Pektindekkede liposomer	267	0,318	-43,4	17000 1 time, 16 000 1 time.	20 °C
Pektindekkede liposomer, ultrasentrifugert	331	0,145	-44,3		
<i>Dekking med HM-pektin</i>					
Pektindekkede liposomer	364,2	0,52	-27,8	17000 1 time, 16 000 1 time	20 °C
Pektindekkede liposomer, ultrasentrifugert	394,5	0,187	-27,5		

6.2.3 Reproduserbarhet av dekkingen ved høy og lav tilsetningshastighet

Partikkelstørrelse og zetapotensiale for pektindekkede positive liposomer produsert ved høy og lav tilsetningshastighet foreligger i Tabell 6-8.

Tabell 6-8: Partikkelstørrelse (str.) og zetapotensiale (zeta) for positive liposomer, pektin og pektindekkede positive liposomer produsert ved lav (7 rpm≈1,2 ml/min) og høy (38 rpm≈5,5 ml/min) tilsetningshastighet.

Preparat	Partikkelstørrelse		Zetapotensiale	
	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)	Width
<i>Før dekking</i>				
Liposomer (DPPC + 10% DPTAP, 3mM)	183	0,188	23,6	1,6
LM-pektin 0,05 % (w/w)*	293	1	-4,8	8,3
<i>Pektindekkede liposomer</i>				
Lav-1	215	0,242	-43,8	1,6
Lav-2	212	0,223	-43,8	1,6
Lav-3	211	0,23	-43,9	1,6
Lav-4	216	0,252	-44,3	1,6
Høy-1	205	0,22	-44,3	1,6
Høy-2	212	0,215	-43,6	6,9**
Høy-2	211	0,199	-44,1	1,6
Høy-4	211	0,215	-43,7	1,6

*Str. målt ufortynnet. Zetap. målt 200 µl: 3 ml buffer. **En positiv topp med svært lav intensitet.

Ved hjelp av den statistiske programvaren Minitab versjon 15, ble deskriptiv statistikk for prøvene beregnet:

Variable	N	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
7 rpm	4	213,63	2,60	211,00	211,22	213,50	216,15
38 rpm	4	209,13	2,90	204,80	206,15	210,45	210,78

Standardavvikene var 2,6 og 2,9 nm og gjennomsnittene 213,6 og 209,1 nm for tilsetningshastighet på henholdsvis 7 rpm ($\approx 1,2$ ml/min) og 38 rpm ($\approx 5,5$ ml/min). Dette gir relative standardavvik for produksjon ved 7 og 38 rpm på henholdsvis 1,2 % og 1,4 %.

Etter ultrasentrifugering økte partikkelstørrelsen for de pektindekkede liposomene, mens zetapotensialene forble uendret (Tabell 6-9). Økningen i partikkelstørrelse var signifikant i en paret t-test ($T=15.4$, $df=7$, $p<0,0005$). For zetapotensiale var det ingen signifikant endring ($T=-1.40$, $df=7$, $p=0,203$). Polydispersitetsindeksen viste en signifikant økning etter ultrasentrifugering ($T=5.21$, $df=7$, $p=0,001$)

Tabell 6-9: Partikkelstørrelse (str.) og zetapotensiale (zeta) for pektindekkede positive liposomer produsert ved lav (7 rpm $\approx 1,2$ ml/min) og høy (38 rpm $\approx 5,5$ ml/min) tilsetningshastighet etter vasking ved ultrasentrifugering.

Pektindekkede liposomer, Ultrasentrifugert	Partikkelstørrelse		Zetapotensiale	
	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)	Width
Lav-1	364	0,304	-43,7	1,6
Lav-2	367	0,277	-44,1	2,7*
Lav-3	372	0,305	-43,2	1,6
Lav-4	379	0,293	-45	3,1*
Høy-1	299	0,304	-44,4	1,6
Høy-2	325	0,324	-43,7	1,6
Høy-2	371	0,353	-44,8	1,6
Høy-4	340	0,24	-45,3	1,6

* En positiv topp med svært lav intensitet.

6.3 DEL 2: Undersøkelse av utvalgte prosess- og formuleringsfaktorerens betydning for produktets egenskaper

6.3.1 Fasetilstand for lipidene, pektinkonsentrasjon og tilsetningsrekkefølge; 2³-design

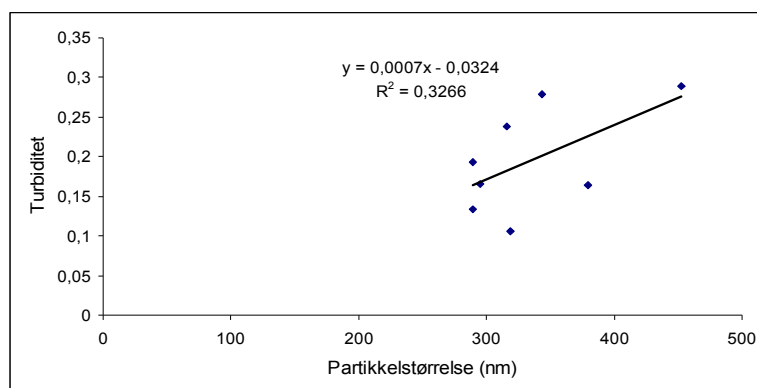
Resultatene for behandlingskombinasjonene av pektindekkede liposomer i det fullfaktorielle forsøket er vist i Tabell 6-10. Størrelsesendringen varierte fra 110 til 290 nm. Zetapotensiale varierte fra -44,2 til -47,9 mV. Ingen av prøvene viste tegn til synlig aggregering ved produksjon.

Tabell 6-10: Zetapotensiale (zeta) og endring i partikkelstørrelse (str.endr.) for behandlingskombinasjonene i 2³ fullfaktorforsøk for dekking av positive liposomer med LM-pektin. Utgangsliposomene hadde størrelse 166 og 184 nm for henholdsvis gel- og flytendefase liposomer.

Designprøve	Behandlingskombinasjon			Responsvariabler	
	Pektin-konsentrasjon w/w%	Fasetilstand	Tilsetningsrekkefølge*	Str.endr. (nm)	Zeta (mV)
1	0,2	Gel	Lip→pek	123	-46,9
2	1	Gel	Lip→pek	123	-46,9
3	0,2	Flytende	Lip→pek	134	-47,9
4	1	Flytende	Lip→pek	111	-47,2
5	0,2	Gel	Pek→lip	286	-44,2
6	1	Gel	Pek→lip	150	-47
7	0,2	Flytende	Pek→lip	195	-46,9
8	1	Flytende	Pek→lip	158	-47,2

* Lip→pek= liposomer dryppes til pektinløsningene, pek→lip = pektin dryppes til liposomene.

Partikkelstørrelse, zetapotensiale og turbiditet for de pektindekkede liposomene, pektinløsninger og de positive liposomene foreligger i vedlegg 2. For å evaluere turbiditetens egnethet som et raskt mål på partikkelstørrelse, ble det laget et scatterplott av turbiditet mot partikkelstørrelse (Figur 6-8). Sammenhengen ble vurdert med lineær regresjon. Den lineære sammenhengen hadde $r^2=0,3266$.



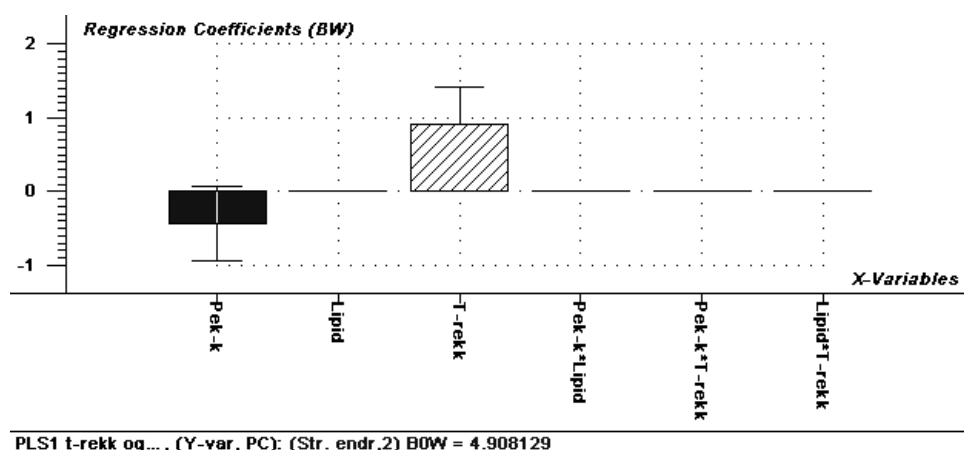
Figur 6-8: Scatterplott av partikkelstørrelse (nm) mot turbiditet for pektindekkede liposomer.

Faktorenes betydning for endring i partikkelstørrelse (PLS-1 analyse).

Det ble laget en regresjonsmodell ved PLS-1 for endring i partikkelstørrelse som funksjon av prosess- og formuleringsfaktorene. Prøve 5 ble fjernet før endelig modell ble laget, fordi den hadde stor påvirkning på modellen (høy leverage i influeceplottet). Fjerningen medførte at resultatene ikke kunne analyseres ved MLR, fordi antallet prøver var for få i forhold til antallet variabler. Prøvene ble analysert ved PLS-1.

Den ferdige modellen hadde en forklaringsgrad på 90 % for variasjonen i størrelsesendringen ved bruk av to PCer. RMSEC var 9,2 nm og RMSEP 20,8 nm.

Tilsetningsrekkefølge (T-rekk) var den eneste faktoren som var signifikant i analysen ($p < 0,05$). Regresjonsplottet (Figur 6-9) viste at faktoren var positivt korrelert til størrelsesendringen. Dette betyr at ved å dryppe pektin til liposomer økte partikkelstørrelsen mer enn ved å benytte motsatt rekkefølge. Pektinkonsentrasjon (pek-k) var ikke signifikant ($p > 0,05$), men ble beholdt i den endelige modellen fordi usikkerhetsgrensene viste at den sannsynligvis var av betydning. Det ble forsøkt å fjerne faktoren fra modellen, men det medførte at forklaringsgraden sank med over 10%, og RMSEC og RMSEP økte. Dette indikerte også at pektinkonsentrasjonen antageligvis var betydningsfull. Regresjonsplottet (Figur 6-9) viste at trenden for pektinkonsentrasjonen var i negativ retning, det vil si mindre størrelsesendring ved økt pektinkonsentrasjon. De øvrige plottene fra PLS-1-modellen foreligger i vedlegg 2.



Figur 6-9: Vektete regresjonskoeffisienter for faktorenes effekt på størrelsesendringen i 2^3 -designet. Skravert faktor (tilsetningsrekkefølge) var signifikant.

Faktorenes betydning for zetapotensiale

Ved modellering av faktorenes betydning på zetapotensiale ble prøve 5 identifisert som en uteligger med stor betydning på modellen (høy leverage i influenceplottet). Prøve 5 ble fjernet og dataene ble forsøkt modellert ved hjelp av PLS-1. Det ble ikke funnet noen signifikante faktorer. Det ble forsøkt å lage en modell der alle faktorene foruten den med størst effekt, fasetilstand av liposomsuspensjon, ble fjernet en etter en. Denne forklarte bare 30% av variasjonen i zetapotensiale ved én PC. Det ble konkludert med at variasjonen i faktorene i faktorforsøket ikke kunne forklare variasjonen i zetapotensiale til de pektindekkede liposomene.

6.3.2 Lipidkonsentrasjon, mengde ladet lipid, tilsetningshastighet og pektinkonsentrasjon; 2^{4-1} - design.

Resultatene for behandlingskombinasjonene av pektindekkede liposomer i det reduserte faktorforsøket foreligger i Tabell 6-11. Endring i partikkelstørrelse varierte i designet fra 8 til 508 nm, zetapotensiale fra -29,6 til -48 mV og polydispersitetsindeksen fra 0,175 til 0,529. For senterprøvene, som estimerte den eksperimentelle feilen, var variasjonen som forventet lavere. Ingen av prøvene viste synlig tegn til aggregering ved produksjon eller sedimentering over natt. Prøve 6a skilte seg ut fra resten av prøvene, med høyere PI (0,529), større økning

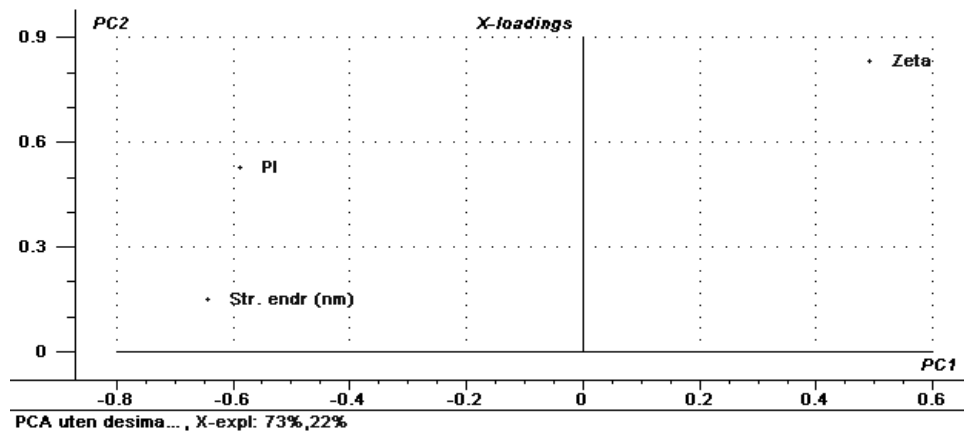
partikkelstørrelse (508 nm) og lavere zetapotensiale (-29,6 mV). Denne prøven sedimenterte i hetteglasset i løpet av 14 dager. Partikkelstørrelse og zetapotensiale til de pektindekkede liposomene, pektinløsningene og de positive liposomene foreligger i vedlegg 3.

Tabell 6-11: Endring i partikkelstørrelse (str.endr.), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensiale (zeta) for behandlingskombinasjonene i et 2⁴⁻¹ redusert faktorforsøk for dekking av positive liposomer med LM-pektin. Liposomene før dekking hadde størrelser fra 121 til 151 nm.

Prøve	Behandlingskombinasjon				Responsvariabler		
	Lipid-kons. (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Tilsetnings-hastighet (rpm)	Pektin-kons. (w/w%)	Str.endr (nm)	PI	Zeta (mV)
1a	3	2	7	0,05	8	0,175	-34,5
2a	10	2	7	0,2	115	0,456	-42,5
3a	3	10	7	0,2	105	0,287	-48
4a	10	10	7	0,05	200	0,423	-43
5a	3	2	38	0,2	134	0,409	-45,4
6a	10	2	38	0,05	508	0,529	-29,6
7a	3	10	38	0,05	64	0,213	-45,1
8a	10	10	38	0,2	194	0,398	-46,4
cent-a	6,5	6	22,5	0,125	83	0,229	-43,2
cent-b	6,5	6	22,5	0,125	82	0,211	-43,5
cent-c	6,5	6	22,5	0,125	109	0,248	-43,6

PCA av responsvariablene

Sammenhengene mellom responsene i det reduserte faktorforsøket ble analysert ved hjelp av PCA. Scoreplott, influenceplott og plottet for predikert mot målt Y-verdi viste at prøve 6a skilte seg ut som en uteligger med stor betydning på modellen. Prøven ble derfor fjernet før den endelige PCA-modellen ble laget.



Figur 6-10: Ladningsplott for PCA av størrelsesendring ved dekking (str. endr.), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensialet (zeta) i redusert faktorforsøk (2^{4-1} -design) for dekking av liposomer med pektin.

Ladningsplottet (Figur 6-10) viste at endringen i partikkelstørrelse var positivt korrelert til polydispersitetsindeksen, mens disse variablene igjen hadde negativ, men mindre uttalt, korrelasjon til zetapotensialet. Modellen forklarte variasjonen i responsverdiene med 95% ved bruk av to PCer. De resterende plottene foreligger i vedlegg 3.

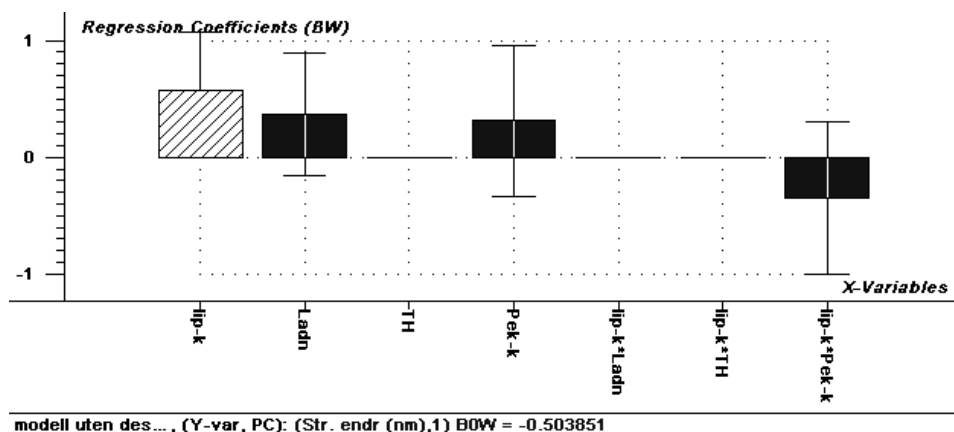
Faktorenes betydning for endring i partikkelstørrelse (PLS-1 analyse).

Det ble laget en regresjonsmodell ved PLS-1 for endring i partikkelstørrelse ved dekking som funksjon av prosess- og formuleringsfaktorene i det reduserte faktorforsøket. Scoreplott, influenceplott og plottet for predikert mot målt Y-verdi viste at prøve 6a skilte seg ut som en uteligger med stor betydning på modellen.

Prøven ble derfor fjernet.

Den beste midlertidige modellen som ble funnet forklarte 80% av variasjonen i størrelsesendringen ved bruk av én PC. Denne modellen hadde RMSEC på 24 nm og RMSEP på 48 nm.

Lipidkonsentrasjonen (lip-k) var den eneste faktoren som hadde signifikant påvirkning på størrelsesendringen ($p < 0,05$). Vektet regressjonskoeffisient hadde positiv verdi, hvilket betyr at partikkelstørrelsene økte mer ved økt lipidkonsentrasjon (Figur 6-11).



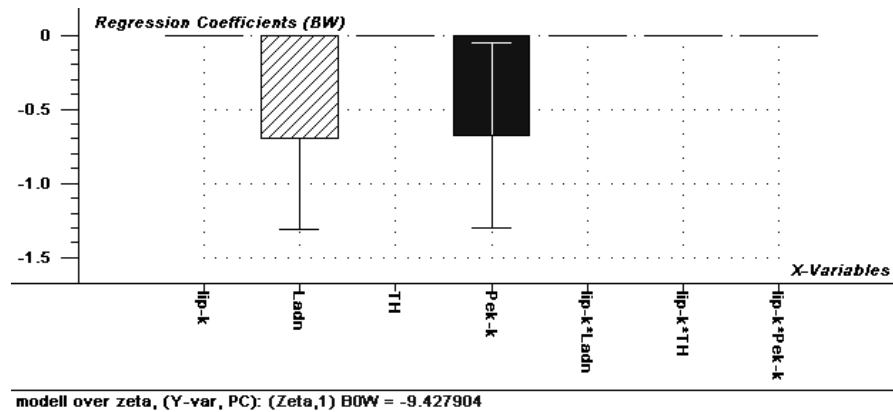
Figur 6-11: Vektete regresjonskoeffisienter for faktorenes effekt på størrelsesendringen i 2^{4-1} -designet. Skravert faktor (lipidkonsentrasjon) var signifikant.

De vektete regresjonskoeffisientene til pektinkonsentrasjonen (pek-k) og mengde ladet lipid (ladn) var positive, hvilket betyr partikkelstørrelsene økte mer ved økning av faktorene. Faktorene var ikke signifikante og usikkerhetsgrensene var store. Det ble forsøkt å fjerne pektinkonsentrasjonen, som hadde lavest vektet regresjonskoeffisient, fra modellen. Fjerningen medførte imidlertid at forklaringsgraden sank til 57% og RMSEC økte til 35 nm. Begge faktorene ble beholdt i den midlertidige modellen. Vektet regresjonskoeffisient for samspillet mellom lipidkonsentrasjon og pektinkonsentrasjon var negativ, men ikke signifikant. Samspillet ble beholdt fordi regresjonskoeffisienten var større enn pektinkonsentrasjonens regresjonskoeffisient (Figur 6-11). Plottene fra PLS-1-modellen foreligger i vedlegg 3.

Faktorenes betydning for zetapotensiale (PLS-1 analyse).

Det ble laget en regresjonsmodell ved PLS-1 for endring i zetapotensiale til de pektindekkede liposomene (zeta) som funksjon av prosess- og formuleringsfaktorene i det reduserte faktorforsøket. Scoreplott, influenceplott og plottet for predikert mot målt Y-verdi viste at prøve 6a skilte seg ut som en uteligger med stor betydning på modellen. Prøven ble derfor fjernet før modelleringen.

Modellen hadde en forklaringsgrad på 79 % for variasjonen i zetapotensiale ved bruk av én PC. RMSEC og RMSEP for modellen var henholdsvis 1,6 og 2,7 mV.



Figur 6-12: Vektete regresjonskoeffisienter for faktorenes effekt på zetapotensialet i 2^{4-1} -designet. Skravert faktor (mengde ladet lipid) var signifikant.

Mengde ladet lipid (ladn) var den eneste faktoren som var signifikant ($p < 0,05$).

Effekten av denne faktoren var negativ (Figur 6-12), hvilket betyr at zetapotensiale ble mer negativt ved økt mengde ladet lipid. I tillegg ble pektinkonsentrasjonen beholdt i modellen. Faktoren hadde en negativ regresjonskoeffisient (Figur 6-12).

Trenden var dermed at zetapotensiale ble mer negativt ved økning i pektinkonsentrasjonen. Dersom pektinkonsentrasjonen ble fjernet fra modellen, sank forklaringsgraden til 34 %. Usikkerhetsgrensene viste også at faktoren sannsynligvis var betydningsfull. Pektinkonsentrasjonen ble derfor vurdert til å være viktig for modellen og beholdt. Plottene fra PLS-1-modellen foreligger i vedlegg 3.

6.3.3 Optimalisering av formuleringen; central composite design

Forforsøk til optimaliseringsdesignet

Forforsøk 1

I første forforsøk ble det produsert pektindekkede positive liposomer med lav pektinkonsentrasjonen (0,05 w/w%), lav mengde ladet lipid (2 mol%) og høy lipidkonsentrasjonen (10 mM), men med tilsetningshastigheten redusert til lavt nivå (7 rpm). Resultatet var komplekser med gjennomsnittlig partikkelstørrelse på 537 nm og polydispersitetsindeks på 1. Henstand over natt medførte sedimentering i hetteglasse med en klar supernatant.

Forforsøk 2

Tabell 6-12 viser resultatene fra forforsøk 2. Dette undersøkte muligheten for å avgrense forsøksrommet slik at kombinasjoner som ga aggregater ble unngått i optimaliseringsdesignet. Av de produserte pektindekkede liposomene var det bare prøven med lipidkonsentrasjon 8,25 mM, 4 mol% ladning og 0,0875 % (w/w) pektin som ikke sedimenterte i hetteglass over natt. Denne prøven hadde relativt lav partikkelstørrelse (375 nm) og lav polydispersitetsindeks (0,348). For de to andre batchene var partikkelstørrelsene høyere (670-830 nm) og fordelingene brede (PI 0,66-0,75). De to sedimenterte prøvenes zetapotensiale var mindre negative enn den ikke-sedimenterte prøven.

Tabell 6-12: Partikkelstørrelse (Str.), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI), zetapotensiale og observasjon av sedimentering for pektindekkede liposomer i forforsøk til optimaliseringsdesign. -1, 0 og 1 representerer henholdsvis lavt, middels og høyt nivå av faktorene.

Kombinasjon	Behandlingskombinasjon			Responsvariabler			
	Lipid-konsentrasjon (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Pektin-konsentrasjon (w/w %)	Str (nm)	PI	Zeta (mV)	Sedimentering over natt
0, -1, -1	6,5	2	0,05	831**	0,663	-29	Ja
1, 0, -1	10	6	0,2	-----Ikke produsert-----			
1, -1, 0	10	2	0,125	672**	0,749	-32,9	Ja
1/2, - 1/2, - 1/2 *	8,25	4	0,0875	375	0,348	-39,4	Nei

* Kombinasjonen er oppgitt relativt til høyt nivå (1) og lavt nivå (-1). **Størrelsesfordeling med topper over 1000 nm.

Optimaliseringsdesignet

Resultatene for behandlingskombinasjonene av pektindekkede liposomer i optimaliseringsdesignet er vist i Tabell 6-13. Størrelsesendringene varierte fra 8 til 200 nm. Zetapotensiale varierte fra -34,5 til -48 mV. I vedlegg 4 er partikkelstørrelse, PI ved størrelsesmåling og zetapotensiale for de pektindekkede liposomene, utgangsliposomene og pektinløsningene oppsummert.

Tabell 6-13: Endring i partikkelstørrelse (str.endr), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensiale (zeta) for behandlingskombinasjonene i central composite design til optimalisering av pektindekkingen. Liposomene før dekking hadde størrelse 121 til 214 nm.

Prøve	Behandlingskombinasjon			Respons	
	Lipid-konsentrasjon (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Pektin-konsentrasjon (w/w%)	Str. endr (nm)	Zeta (mV)
1a	3	2	0,05	8	-34,5
2a	10	2	0,2	115	-42,5
3a	3	10	0,2	105	-48
4a	10	10	0,05	200	-43
5a	3	2	0,2	134	-45,4
6a-ny	8,25	4	0,0875	127	-40,4
7a	3	10	0,05	64	-45,1
8a	10	10	0,2	194	-46,4
*1	3	6	0,125	56	-43,7
*2	10	6	0,125	169	-43,2
*3	6,5	2	0,125	45	-38,7
*4	6,5	10	0,125	66	-45
*5	6,5	6	0,05	136	-41,6
*6	6,5	6	0,2	126	-46,4
ref-1	6,5	6	0,125	83	-43,2
ref-2	6,5	6	0,125	82	-43,5
ref-3	6,5	6	0,125	109	-43,6
cent-1	6,5	6	0,125	108	-44,1
cent-2	6,5	6	0,125	97	-44,7
cent-3	6,5	6	0,125	109	-44,7

Referanseprøvene (ref 1-3) er senterprøvene fra det reduserte faktorforsøket (Tabell 6-11). Disse ble sammenliknet med de nye senterprøvene i en parametrisk test (to-utvalgs t-test) og en ikke-parametrisk test (Mann-Whitney test). Mann-Whitney testen

testet H_0 : Differansen i median er 0 mot H_a : Differansen i median er forskjellig fra 0.

To-utvalgs t-test testet $H_0: \mu_1 = \mu_2$ mot $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$. Resultatene foreligger i Tabell 6-14.

Tabell 6-14: Resultatene fra to statistiske tester for forskjellen mellom senterprøver og referanseprøver. Mann-Whitney testet H_0 : Differansen i median er 0 mot H_a : Differansen i median er forskjellig fra 0. To-utvalgs t-test testet $H_0: \mu_1 = \mu_2$ mot $H_a: \mu_1 \neq \mu_2$.

Mann-Whitney test (ikke-parametrisk)			To-utvalgs t-test (parametrisk)		
	Str. endr	Zeta		Str. endr	Zeta
Differanse i median:	-15 nm	1,1 mV	Differanse i forventning:	-13,5 nm	1,067 mV
W-observator:	8	15	T-verdi:	-1,41	4,57
P-verdi:	0,3827	0,0765	Antall frihetsgrader:	2	3
			P-verdi:	0,294	0,02

Ingen av testene viste statistisk signifikant forskjell i størrelsesendringen ($p > 0,05$).

To-utvalgs t-testen viste signifikant forskjell i zetapotensiale ($p = 0,02$) mens Mann-Whitney testen ikke viste signifikant forskjell i zetapotensiale ($p = 0,0765$). Estimater for forskjellen i median og forventning av zetapotensiale var henholdsvis 1,1 og 1,067 mV. Estimater for forskjellen i median og forventning av størrelsesendringen var henholdsvis 15 og 13,5 nm.

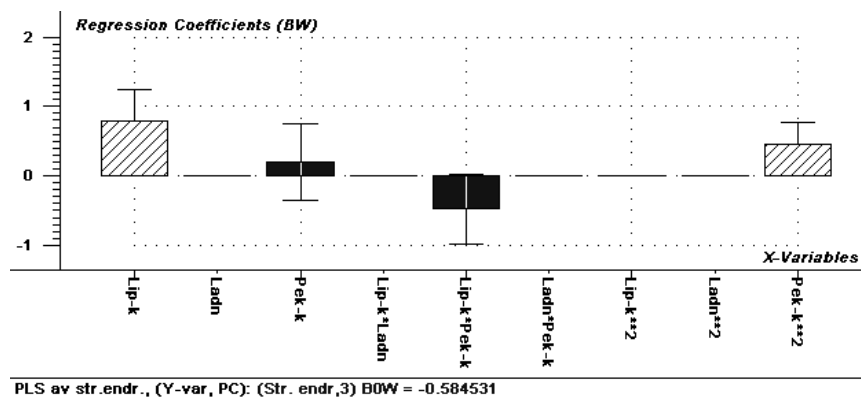
Faktorenes betydning på endring i partikkelstørrelse, optimalisering.

Det ble laget en regresjonsmodell ved PLS-1 for endring i partikkelstørrelse som funksjon av prosess- og formuleringsfaktorene i optimaliseringsdesignet. Modellen inkluderte både hovedeffekter, interaksjoner og annengradsledd. Før modelleringen ble prøve 4a fjernet, da influenceplott, score plott og plottet for predikert mot målt Y-verdi viste at den hadde stor påvirkning på modellen.

Den endelige modellen hadde en forklaringsgrad på 71 % for variasjonen i størrelsesendringen ved bruk av tre PCer. RMSEC og RMSEP var henholdsvis 23 og 35 nm.

Lipidkonsentrasjonen (lip-k) og pektinkonsentrasjonens annengradsledd (pek-k**2) var signifikante ($p < 0,05$, Figur 6-13). Effekten av lipidkonsentrasjonen var positiv.

Det betyr at økt lipidkonsentrasjon økte partikkelstørrelsene. Effekten av pek-k^{**2} var også positiv (Figur 6-13). Det betyr at økt pektinkonsentrasjonen økte partikkelstørrelsene, men med en krummet effekt. Den negative interaksjonen mellom lipidkonsentrasjon og pektinkonsentrasjon ($\text{lip-k} * \text{pek-k}$) ble også beholdt i modellen, da usikkerhetsgrensene i regresjonskoeffisientene viste at den var nært grensen for å være signifikant. Modellens forklaringsgrad sank til 55 % (to PCer) når interaksjonsleddet ble forsøkt fjernet.



Figur 6-13: Vektete regresjonskoeffisienter for faktorenes effekt på zetapotensialet i optimaliseringsdesignet. Skraverte faktorer (lipidkonsetrasjon og pektinkonsentrasjonens annengradsledd) var signifikante.

Faktorenes betydning på zetapotensiale, optimalisering

Det ble laget en regresjonsmodell for prosess- og formuleringsfaktorenes betydning for zetapotensiale til de pektindekkede liposomene i optimaliseringsdesignet.

Modellen inkluderte både hovedeffekter, interaksjoner og annengradsledd. Det var ingen prøver som skilte seg ut som uteliggere og måtte fjernes før modelleringen. Modellen ble laget både ved PLS-1 og MLR.

Modellene med MLR og PLS1-1 identifiserte de samme signifikante faktorene:

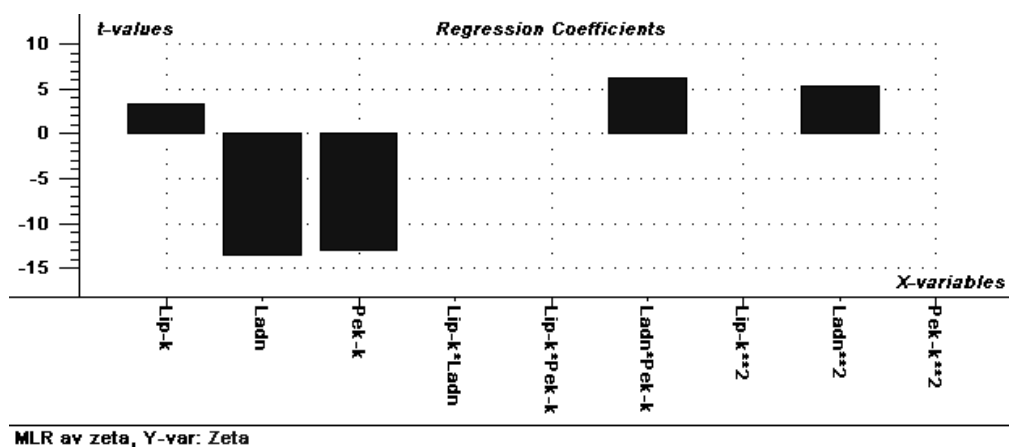
Lipidkonsentrasjon (lip-k), mengde ladet lipid (ladn), pektinkonsentrasjon (pek-k), samspillet $\text{ladn} * \text{pek-k}$ og ladn^{**2} (Tabell 6-15). Ladt og pek-k hadde negativ effekt på zetapotensiale, det vil si at en økning i faktorene gjorde zetapotensiale mer negativt. De resterende faktorene hadde positiv effekt, hvilket betyr at zetapotensiale ble mindre negativt ved økning i faktorene. Ingen ikke-signifikante faktorer ble

beholdt i modellen. ANOVA-tabellen viste at modellen i sin helhet var signifikant med $p\text{-verdi} < 0,00005$ (Tabell 6-15). PLS 1-modellen hadde en forklaringsgrad på 96% ved bruk av to PCer. Plottene fra modelleringene foreligger i vedlegg 4.

Tabell 6-15: ANOVA-tabell over faktorenes betydning på zetapotensiale til de pektindekkede liposomene i central composite designet. Lip-k=lipidkonsentrasjon, ladn=molprosent ladet lipid og pek-k= pektinkonsentrasjon.

	SS	DF	MS	F-ratio	p-value	B-coefficients	STDerr
Summary							
Model	160.556	5	32.111	67.612	0.0000		
Error	6.649	14	0.475				
Adjusted Total	167.205	19	8.800				
Variable							
Intercept	1.321e+03	1	1.321e+03	2.781e+03	0.0000	-35.651	0.676
Lip-k	5.207	1	5.207	10.963	0.0051	0.220	6.648e-02
Ladn	87.440	1	87.440	184.111	0.0000	-0.781	5.754e-02
Pek-k	80.566	1	80.566	169.636	0.0000	-40.246	3.090
Lip-k*Ladn	m		M	M	m	0.000	M
Lip-k*Pek-k	m		M	M	m	0.000	M
Ladn*Pek-k	18.508	1	18.508	38.970	0.0000	0.815	0.131
Lip-k**2	m		M	M	m	0.000	M
Ladn**2	13.162	1	13.162	27.714	0.0001	0.829	0.158
Pek-k**2	m		M	M	m	0.000	M

T-verdiene til regresjonskoeffisientene fra MLR-modellen viste at de viktigste effektene for zetapotensiale var pektinkonsentrasjonen og mengde ladet lipid (Figur 6-14). Minst betydning hadde lipid konsentrasjonen.



Figur 6-14: T-verdiene for regresjonskoeffisientene fra MLR av central composite designet. Lip-k=lipidkonsentrasjon, ladn=molprosent ladet lipid og pek-k= pektinkonsentrasjon.

6.3.4 Faktorforsøkernes relevans for HM-pektin og amidert petkin

Resultatene for 3 faktorkombinasjoner av positive liposomene dekket med HM- og amidert pektin vises i Tabell 6-16.

Tabell 6-16: Endring i partikkelstørrelse (str.endr.) polydispersitetsindeks (PI) og zetapotensiale (zeta) for ulike behandlingskombinasjoner av liposomer dekket med HM-pektin og amidert (Am) pektin.

Prøve	Behandlingskombinasjon				Responser		
	Lipid-kons. (mM)	Mengde ladet lipid (mol%)	Tilsetnings-hastighet (rpm)	Pektin-konsentrasjon (w/w%)	Str. endr (nm)*	PI	Zeta (mV)
HM-aggr.	10	2	38	0,05	497	0,415	-22,7
Am-aggr.	10	2	38	0,05	672	0,458	-29,4
HM-cent	6,5	6	7	0,125	203	0,346	-26,9
Am-cent.	6,5	6	7	0,1255	100	0,256	-39,9
HM-flyttet	8,25	4	7	0,0875	266	0,346	-26,6
Am-flyttet	8,25	4	7	0,0875	259	0,372	-38,5

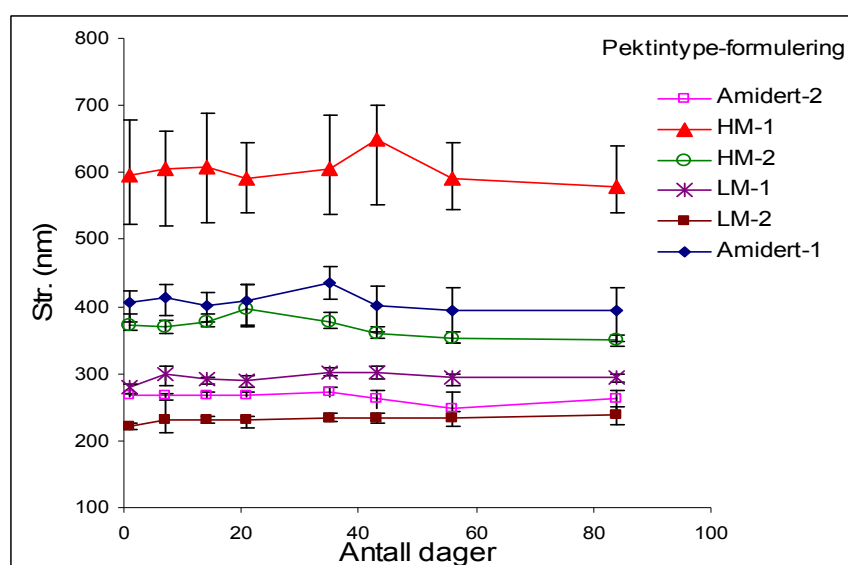
*Liposomer før dekking var for HM- og Am-aggr. 188 nm, for HM- og Am-cent 187 nm og for HM- og Am-flyttet 126 nm

Ingen av prøvene sedimenterte i hetteglassene over natten, men etter 1 uke var HM-aggr. og Am aggr. sedimentert. Disse hadde lav pektinkonsentrasjon, lav mengde ladet lipid, høy lipidkonsentrasjon og høy tilsetningshastighet.

6.4 DEL 3: Stabilitetsstudie av pektindekkede liposomer.

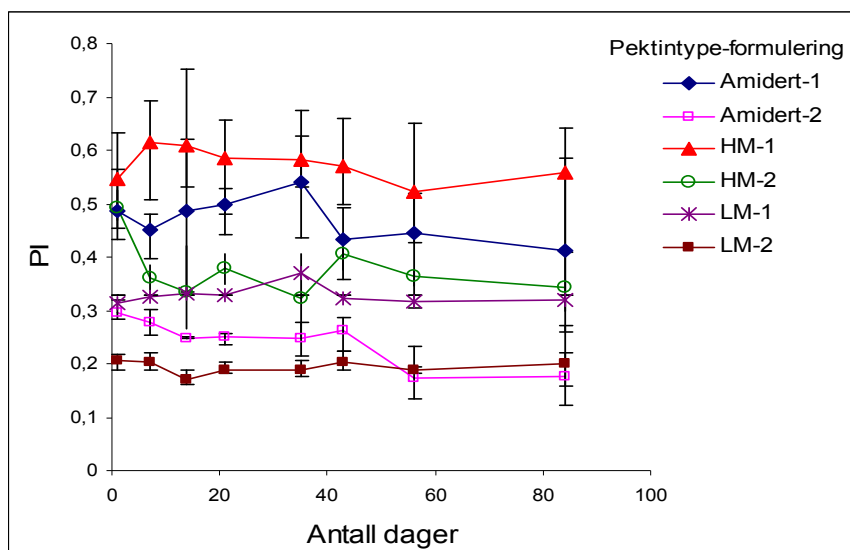
I stabilitetsstudien ble partikkelstørrelse, zetapotensiale og pH for positive liposomer dekket med LM-, HM- og amidert pektin observert i en periode på 12 uker. For hver pektintype ble to formuleringer med forskjellig lipid og pektinkonsentrasjon undersøkt. Formulering 1 hadde middels høy pektinkonsentrasjon og høy lipidkonsentrasjon, og formulering 2 hadde lav pektin og lipidkonsentrasjon. Batchene ble oppbevart i kjøleskap under studieperioden.

Partikkelstørrelsene til alle batchene av pektindekkede liposomer var stabile i de 12 ukene studien pågikk, slik Figur 6-15 viser. Partikkelstørrelsen til de pektindekkede liposomene varierte mellom formuleringene. For alle pektintypene hadde formulering 1 høyere partikkelstørrelse enn formulering 2. Liposomer dekket med HM-pektin hadde høyest partikkelstørrelser i begge formuleringene, mens liposomer dekket med LM-pektin hadde lavest partikkelstørrelser.



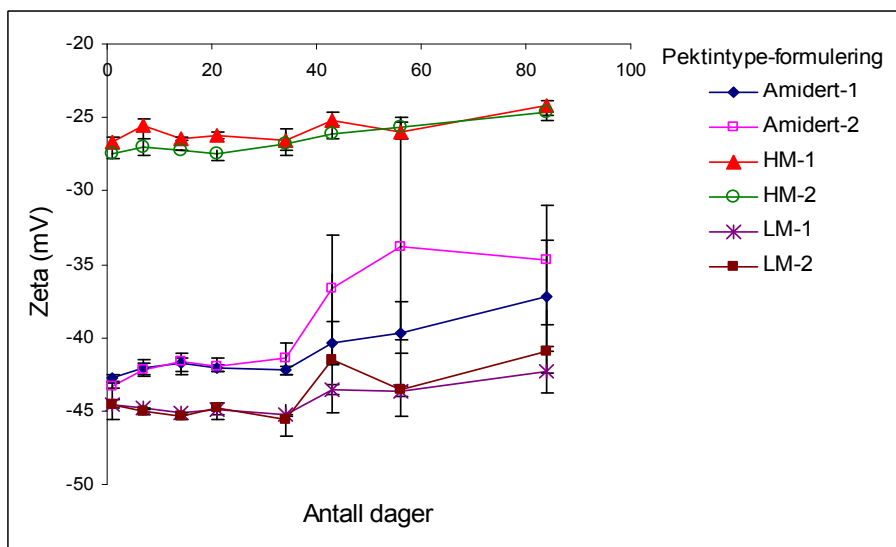
Figur 6-15: Partikkelstørrelsen (Str.) til pektindekkede liposomer over en periode på 12 uker (84 dager). Formulering 1: Lipidkonsentrasjon 10 mM, pektinkonsentrasjon 0,125 % (w/w) Formulering 2: Lipidkonsentrasjon 3 mM, pektinkonsentrasjon 0,05 % (w/w)

Polydispersitetsindeksen endret seg lite i studieperioden (Figur 6-16). Formulering 1 for HM-og amidert pektin skilte seg ut med høye polydispersitetsindekser.



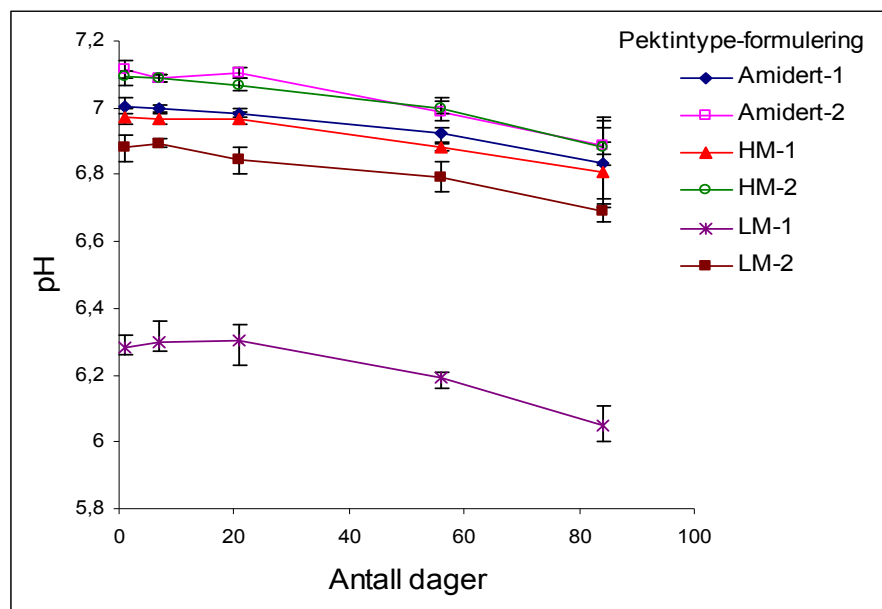
Figur 6-16: Polydispersitetsindeks (PI) ved størrelsesmåling for pektindekkede liposomer over en periode på 12 uker (84 dager). Formulering 1: Lipidkonsentrasjon 10 mM, pektinkonsentrasjon 0,125 %(w/w) Formulering 2: Lipidkonsentrasjon 3 mM, pektinkonsentrasjon 0,05 %(w/w)

Zetapotensialene til de pektindekkede liposomene var stabile de første 5 ukene, for så å bli gradvis mindre negative (Figur 6-17). Liposomer dekket med amidert pektin viste mest endring i zetapotensiale for begge formuleringer, mens liposomer dekket med HM-pektin viste minst endring.



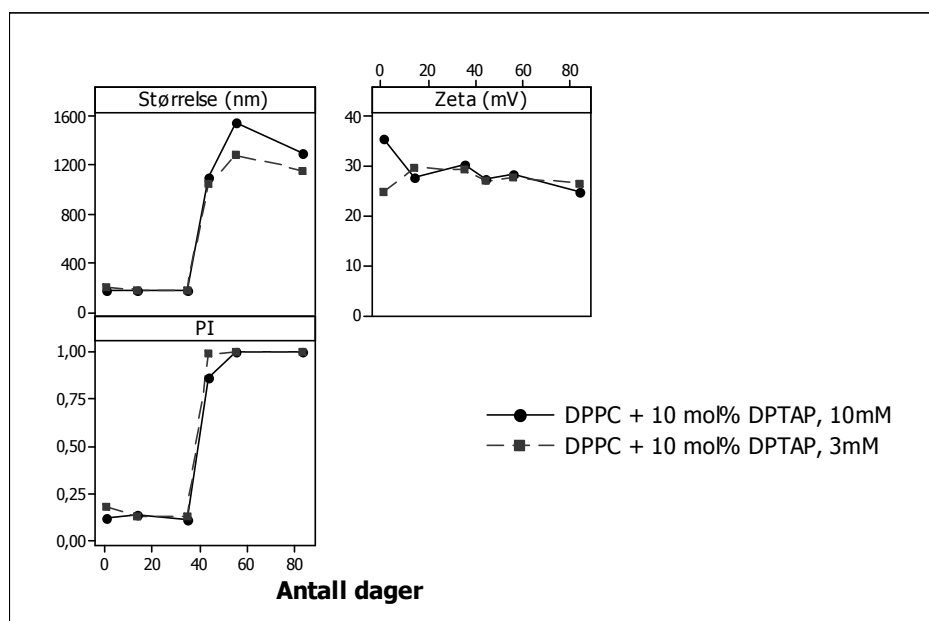
Figur 6-17: Zetapotensiale til pektindekkede liposomer over en periode på 12 uker (84 dager). Formulering 1: Lipidkonsentrasjon 10 mM, pektinkonsentrasjon 0,125 %(w/w) Formulering 2: Lipidkonsentrasjon 3 mM, pektinkonsentrasjon 0,05 %(w/w)

pH for de pektindekkede liposomene ble svakt surere i løpet av studieperioden (Figur 6-18). For alle pektintypene hadde formulering 1 lavest pH. Formulering 1 av liposomer dekket med LM-pektin skilte seg ut med klart lavest pH.



Figur 6-18: pH for pektindekkede liposomer over en periode på 12 uker (84 dager).
 Formulering 1: Lipidkonsentrasjon 10 mM, pektinkonsentrasjon 0,125 %(w/w)
 Formulering 2: Lipidkonsentrasjon 3 mM, pektinkonsentrasjon 0,05 %(w/w)

Partikkelstørrelse, polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling og zetapotensiale for udekkede positive liposomer vises i Figur 6-19. Figuren viser at partikkelstørrelse og polydispersitetsindeks økte kraftig etter ca 35 dager. Zetapotensialene til liposomene sank svakt gjennom perioden.



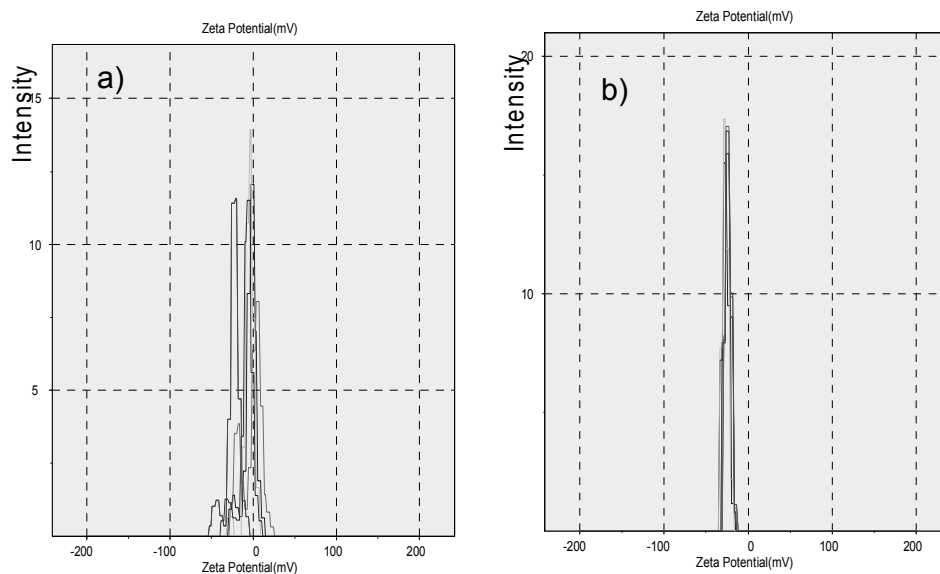
Figur 6-19: Partikkelstørrelse, polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensiale for udekkede positive liposomer ved lagring i 12 uker (84 dager).

Gjennom hele studieperioden hadde pektinløsningene anvendt ved dekkingen mindre negative zetapotensiale enn de pektindekkede liposomene (Tabell 6-17 og Figur 6-17). Tabell 6-17 viser også at toppene for zetapotensiale til pektinløsningene var brede. Forskjellen mellom zetapotensialene til pektinløsningene og de pektindekkede liposomene var videre tydelig i grafene for zetapotensialene. Pektinløsningenes grafer hadde mange spredte topper eller noen få topper rundt null, mens de pektindekkede liposomenes grafer hadde én smal, negativ topp. Et eksempel på dette er vist for formulering 1 med HM-pektin etter 12 uker i Figur 6-20. I vedlegg 5 foreligger grafene for zetapotensialene til de resterende pektinløsningene og de pektindekkede liposomene etter 12 uker.

Tabell 6-17: Zetapotensiale og toppbredde for pektinløsningene over 12 uker. Målingen ble gjort ved samme fortynning som for de pektindekkede liposomene.

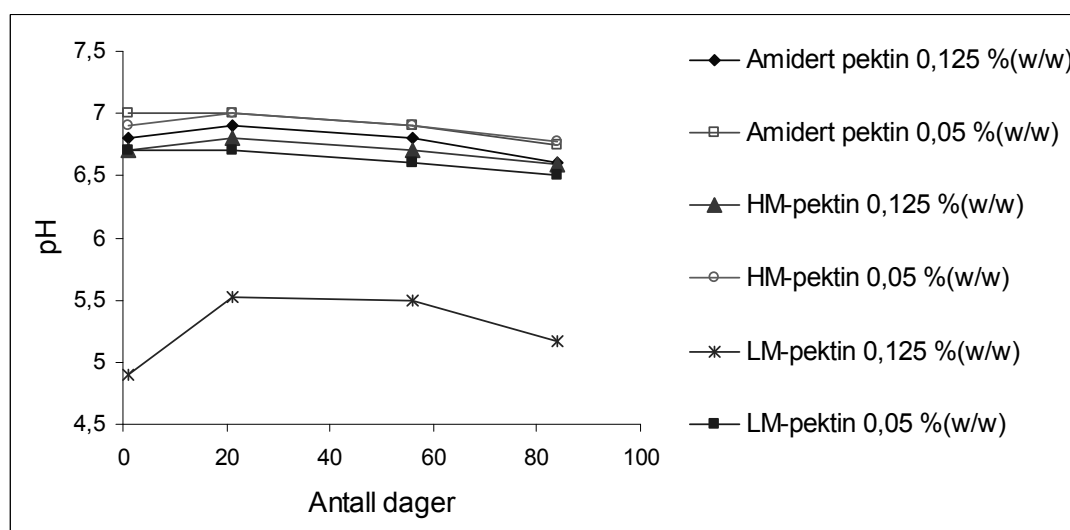
Pektinløsning (%w/w)	1 dag		3 uker		8 uker		12 uker	
	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width
HM-pektin 0,05	-26,6	11,7	-1,8	21*	-5,6	13,9*		
HM-pektin 0,125	-15,8	27,7*	-4,8	20,3*	-8,6	7,2		
Amidert pektin 0,05	-14,4	28,1*	-3,5	23*	-4,7	11,3*		
Amidert pektin 0,125	-26	36,9	-21	34,7*	-40,3	25,3*		
LM-pektin 0,05	-7	14*	-2,3	4,5	-10,9	38,1*		
LM-pektin 0,125	-13,5	12,8*	-6,4	10,3*	-3,3	1,6		

* Zetapotensialet var splittet i mange topper.



Figur 6-20: Zetapotensiale (mV) til a) HM-pektin 0,125 % (w/w) og b) Formulering 1 med HM-pektin (liposomer dekket med 0,125 % (w/w) HM-pektin). Målt etter lagring i 12 uker ved kjøleskapstemperatur og ved samme fortynning før måling.

pH i pektinløsningene endret seg lite de første 8 ukene, men var for alle løsningene sunket etter 12 uker (Figur 6-21). Dette liknet pH-utviklingen for de pektindekkede liposomene.



Figur 6-21: pH i pektinløsningene ved lagring i 12 uker. Konsentrasjonen 0,125 og 0,05 % (w/w) ble benyttet for produksjon av henholdsvis formulering 1 og 2 av pektindekkede liposomer.

7. Diskusjon

7.1 Karakterisering av pektin

Bestemmelse av molekylvekt

Molekylvekten til pektin varierer med plantekilde, råmateriale og ekstraksjonsbetingelser (Voragen, A. G. J. et al. 1995). Undersøkelse av molekylvekt for det anvendte pektinet var derfor nødvendig.

I litteraturen finnes det ulike varianter av Mark-Houwink-Sakurada likningen, $[\eta] = K \cdot M_w^\alpha$, for beregning av pektins molekylvekt. Likningen $[\eta] = 9,55 \cdot 10^{-2} \cdot M_w^{0,73}$ ml/g kan benyttes uavhengig av esterifiseringsgrad og pektinkilde (Anger, H. og Berth, G. 1984) og det ble derfor valgt å benytte denne. I andre kilder er sammenhengen oppgitt som $[\eta] = 4,7 \cdot 10^{-5} \cdot M_w^1$ g/100 ml for det samme løsemiddelsystemet som ble brukt i dette arbeidet (Christensen, P. E. 1954). Til sammenlikning ble molekylvekten beregnet ved denne likningen også.

Molekylvekten for LM-pektin, HM-pektin og amidert pektin ble beregnet til henholdsvis $\approx 1,8 \cdot 10^4$, $\approx 1,3 \cdot 10^5$ og $\approx 7,2 \cdot 10^4$ g/mol (Tabell 6-1) etter Mark-Houwink-Sakurada likningen forelått av Anger med flere (Anger, H. og Berth, G. 1984). Den andre anvendte likningen (Christensen, P. E. 1954) ga tilsvarende resultater. HM-pektin hadde den klart høyeste beregnede molekylvekten. For LM-pektin var hugginskonstanten i løsemidlet svært høy, 12,22, i motsetning til 0,51 for både HM- og amidert pektin (Tabell 6-1). En så høy hugginskonstant tyder på at løsemidlet ikke er optimalt for polymeren, eventuelt tilstedeværelse av aggregater (Sakai, T. 1968). Den høye hugginskonstanten gjorde derfor at estimatet for molekylvekten til LM-pektin ble usikkert.

For HM-pektin og amidert pektin var den beregnede hugginskonstanten i natrium heksametafosfat innenfor θ -betingelsene (0,5-0,7) hvor intermolekulære interaksjoner

er i samme størrelsesorden som de intramolekylære interaksjoner (Sakai, T. 1968). Det er derfor sannsynlig at den beregnede forskjellen i molekylvekt mellom amidert pektin og HM-pektin stemmer.

Hiorth med flere (2003) beregnet molekylvekten til LM-pektin (DM35) som $5 \cdot 10^4$ g/mol. Målingene ble gjort i samme løsemiddelsystem som i dette arbeidet, men LM-pektin hadde en hugginskonstant på 0,5-0,6. Molekylvektbestemmelsen var derfor mindre usikker. Forskjellen i estimert molekylvekt for LM-pektin i dette arbeidet og i arbeidet til Hiorth med flere (2003), kan skyldes batch til batch variasjon. En annen mulighet er at LM-pektin ble noe underestimert i dette arbeidet, og det er derfor usikkert om den beregnede forskjellen mellom amidert pektin og LM-pektin er reell.

Bestemmelse av hugginskonstanten i 5 mM fosfatbuffer pH 7

Hensikten med å undersøke hugginskonstanten til alle pektintypene i 5 mM fosfatbuffer pH 7, var å undersøke hvor godt løsemiddel denne bufferen er for pektin.

Hugginskonstantene for LM-, HM- og amidert pektin var henholdsvis 0,094, 0,263 og 0,346 (Tabell 6-2). Disse lave hugginskonstantene ($k' < 0,5$) betyr at fosfatbufferen er et godt løsemiddel for alle pektintypene og at polymerenes kjeder var utstrakt i løsemiddelet (Sakai, T. 1968). Resultatet var som forventet, da pektin er en polykarboksylsyre og deprotoneringen av svake syrer øker ved økende pH. Økt ladning på molekylet ekspanderer kjedene (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005). Dersom kjedene hadde vært aggregert til supramolekylære komplekser, ville det kunne forstyrre partikkelstørrelsesmålingene av pektindekkede liposomer. Det er også mulig at det ville vært vanskeligere å få jevn assosiering av pektin rundt liposomer dersom individuelle pektinmolekyler var sammenkveilet på grunn av sterke intramolekylære krefter. Derfor er det gunstig med lav hugginskonstant for pektin under dekkningen av liposomer, og 5 mM fosfatbuffer pH 7 er i så måte et egnet løsemiddel.

Egenviskositeten i fosfatbuffer var for alle pektintypene høyere enn i natrium heksametafosfat. En slik økning i egenviskositet kan forklares med at økt

ladningstetthet ga repulsjon mellom kjedene slik at disse ble ekspandert (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005). Egenviskositeten til LM-pektin var fremdeles lavest.

LM-pektin hadde vesentlig lavere hugginskonstant enn både amidert pektin og HM-pektin. Resultetet var som forventet, da LM-pektin har lavest metoksyleringsgrad og dermed flest frie syregrupper som kunne deprotoneres (Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. 2002).

Molekylvekt og hvor ekspanderte kjedene er, er viktige faktorer for egenviskositeten til polymerer (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005). LM-pektin hadde lavest egenviskositet til tross for at den lave hugginskonstanten indikerte at kjedene var svært utstrakt. Sett sammen kan dette tyde på at LM-pektin faktisk hadde lavest molekylvekt. Andre faktorer, som for eksempel grad av forgrening på kjedene, kan imidlertid også ha betydning for egenviskositeten.

Oppsummering: Karakterisering av pektin

Molekylvektsbestemmelsen viste variasjon i molekylvekt mellom pektintypene. HM-pektin skilte seg ut med høyest molekylvekt, og LM-pektin hadde lavest beregnet molekylvekt. Hugginskonstantene i fosfatbuffer pH 7 viste at denne bufferen var et godt egnet løsemiddel for alle pektintypene. Samtidig ga de en ekstra indikasjon på at molekylvekten til LM-pektin var den laveste.

Til oppsummering hadde LM-pektin høyest negativ ladning og mest utstrakte kjeder i fosfatbuffer pH 7. HM-pektin og amidert pektin hadde noe mindre utstrakte kjeder, trolig på grunn av mindre negativ ladning. Både pektinets molekylvekt, kjedenes netto ladning og kjedenes konformasjon kan forventes å ha betydning for produktene ved dekking av liposomer.

7.2 Del 1: Verifisering av dekkingen og reproduserbarhet av metoden.

Hensikten med del 1 var å:

1. Undersøke om det var mulig å fremstille pektindekkede liposomer med den valgte metoden.
2. Verifisere at liposomene faktisk var dekket med pektin.
3. Undersøke om metoden var reproduserbar.

Valget av metode for å blande liposomsuspensjonene med pektinløsninger ble gjort på bakgrunn av litteratursøk for polymerdekking av liposomer. Mange metoder er beskrevet i litteraturen (Kato, A. et al. 1984; Henriksen, I. et al. 1994; Takeuchi, H. et al. 1994; Henriksen, I. et al. 1997; Takeuchi, H. et al. 2003; Takeuchi, H. et al. 2005), men lite er tidligere gjort på kombinasjonen pektin og liposomer. I de to studiene som ble funnet, var ikke metodene grundig undersøkt (Sriamornsak, P. et al. 2007; Thirawong, N. et al. 2008). Metodene for dekking av negative og nøytrale liposomer med kitosan var derimot grundigere beskrevet, og ble benyttet som utgangspunkt for dekkingen av liposomer med pektin (Henriksen, I. et al. 1994; Henriksen, I. et al. 1997).

Henriksen med flere (1994) viste for kitosan at tilsetning av liposomer til polymerløsning i overskudd ga minst aggregering. Tilsetningen ble gjort ved konstant hastighet. Prosessbetingelsene for dekking av liposomer med pektin ble valgt på bakgrunn av dette.

Ved polymerdekking av liposomer har det ofte blitt benyttet liposomer av motsatt ladning som polymeren (Alamelu, S. og Rao, K. P. 1991; Henriksen, I. et al. 1994; Takeuchi, H. et al. 1994; Henriksen, I. et al. 1997; Mobed, M. og Chang, T. M. 1998; Takeuchi, H. et al. 2003; Takeuchi, H. et al. 2005). Ved kitosandekking var mengde ladet lipid 10 mol% (Henriksen, I. et al. 1994; Henriksen, I. et al. 1997).

Elektrostatisk tiltrekning anntas å være en viktig mekanisme til polymeradsorpsjon (Mobed, M. og Chang, T. M. 1998; Takeuchi, H. et al. 2003; Sriamornsak, P. et al.

2007) Det ble derfor valgt å benytte 10 mol% positiv lipid i liposomene som utgangspunkt ved dekking av liposomer med pektin. Di-acyl-3-trimetylammonium propanene (Diacyl-TAP-ene, Tabell 2-2) ble valgt som ladningsgivende molekyl, fordi disse i studier har vist lav toksisitet mot bukkale cellelinjer (Smistad, G. et al. 2007). Negative liposomer av tilsvarende mengder ladet lipid, 10 mol% DPPG, ble inkludert for å kontrollere om motsatt ladning mellom liposomer og pektin var nødvendig for vellykket dekking.

Pektinkonsentrasjonen i de innledende forsøkene, 0,2 %(w/w), ble valgt på bakgrunnen av forsøkene til Thirawong med flere (2008). I disse forsøkene ble positive liposomer dekket med pektinløsninger i området 0,2 -1 %(w/v). Flere konsentrasjonsnivåer ble inkludert i verifiseringsforsøkene for å øke kunnskapen om systemet.

5 mM fosfatbuffer pH 7 ble valgt som produksjonsmedium fordi svak fosfatbuffer pH 6,8-7 er et vanlig medium for enkel simulering av saliva (Rykke, M. et al. 1988; Rykke, M. og Rølla, G. 1990; Rykke, M. et al. 1990). De lave hugginskonstantene til LM-, HM-, og amidert pektin i bufferen viste videre at den var egnet (Tabell 6-2 og kap 7.1).

7.2.1 Dekking av positive liposomer

Zetapotensiale

Et skift i zetapotensiale fra positivt til negativt eller motsatt er en ofte benyttet metode for å bekrefte polymerdekking av ladete liposomer. For eksempel er det beskrevet for pektin (Thirawong, N. et al. 2008), kitosan (Henriksen, I. et al. 1994), karbopol (Takeuchi, H. et al. 2003) og polyakrylsyre (Takeuchi, H. et al. 1994).

Zetapotensiale for de positive liposomene endret seg fra positivt (+26-27) før dekking, til negativt (-27-47) for de pektindekkede positive liposomene (Tabell 6-3). En elektrostatisk interaksjon mellom positivt ladete liposomer og negativ ladet pektin er tidligere bekreftet ved FT-IR (fourier transform-infra red) spektroskopi

(Sriamornsak, P. et al. 2007). Skiftet i zetapotensiale fra Tabell 6-3 kan indikere at en tilsvarende reaksjon skjedde mellom pektin og de positive liposomene i dette forsøket.

Videre varierte zetapotensiale for de dekkede liposomene mellom pektintypene. For liposomer dekket med amidert og LM-pektin var zetapotensialet -39,6 og -46,9 mV og for liposomer dekket med HM-pektin -27 mV (Tabell 6-3). Denne forskjellen samsvarer med at pektintypene har ulike andeler frie syregrupper. HM-pektin har lavest andel frie syregrupper (Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. 2002), slik at denne pektintypen trolig har mindre negativ ladning i fosfatbufferen. Dette kan ha ført til at liposomer dekket med HM-pektin fikk et mindre negativt zetapotensiale. Tilsvarende forskjell i zetapotensiale mellom liposomer dekket med HM- og LM-pektin er også beskrevet av Thirawong med flere (2008).

Ved bare å studere zetapotensialene for de positive liposomene før og etter dekking, var det ikke mulig å vite om de målte endringene kunne skyldes at pektinløsningene i seg selv ga et målbart, negativt zetapotensiale. Derfor ble zetapotensiale for pektinløsningene grundig undersøkt. For alle pektintypene lå zetapotensiale målt ufortynnet (LM-pektin) eller ved lite fortynning (HM- og amidert pektin) nært zetapotensiale til pektindekkede positive liposomer (Tabell 6-5). Pektinløsningenes zetapotensiale hadde videre én topp med smal toppbredde (Figur 6-4 a, Figur 6-5 a og Figur 6-6 a). Dette kan indikere at det målte zetapotensiale for dekkede liposomer skyldtes at pektinløsningene i overskudd skjulte det positive zetapotensialet til liposomene (Figur 6-3). Grafene for zetapotensialene (Figur 6-4 c, Figur 6-5 c og Figur 6-6 c) viste imidlertid at ved fortynninger hvor zetapotensiale til pektin ble splittet opp i flere topper, beholdt de pektindekkede positive liposomene én topp, eller en samling av nære topper. Disse toppene hadde fremdeles det samme negative zetapotensialet som ufortynnede/lite fortynnede løsninger av pektin. Det er mulig at pektin i de ufortynnede eller lite fortynnede løsningene hadde en tendens til å danne løse aggregater, og at det var disse som ga de målte zetapotensialene. Intermolekylær assosiasjon mellom pektinmolekyler er for eksempel kjent som mekanismen bak pektins evne til å danne geler (Voragen, A. G. J. et al. 1995; Thakur, B. R. et al.

1997). Ved personlig kommunikasjon med produsent av Zetasizer ble det klart at det er vanskelig å utføre meningsfulle målinger av polymerer i løsning. Dette forsterker hypotesen om løse aggregater. Ved fortynningen kan aggregatene ha blitt brutt opp, slik at zetapotensiale ble mer udefinert, eller splittet i flere topper. Det at zetapotensiale til de pektindekkede positive liposomene ikke ble splittet opp ved fortynning, kan tyde på at det var dannet komplekser av pektin elektrostatisk bundet til liposomene. Kompleksene hadde da det samme zetapotensiale som pektinaggregatene, men var sterkere bundet og løste seg ikke opp ved fortynning. Som nevnt overfor, er elektrostatisk bindingen mellom positive liposomer og pektin beskrevet av andre tidligere (Sriamornsak, P. et al. 2007).

Undersøkelsene av pektinløsninger og pektindekkede liposomer ved fortynning ga grunn til å anta at det målte zetapotensialet skyldtes pektindekkede liposomer holdt sammen av elektrostatiske interaksjoner. Zetapotensiale er imidlertid avhengig av løsningens viskositet ved måling (Morfesis, A. 2008). Viskositeten kunne potensielt sett være påvirket av pektin i overskudd. Ved målingene ble det ikke korrigert for en eventuell viskositetsøkning som følge av pektinoverskuddet i prøvene. Dette fordi viskositetsøkningen ble vurdert til å ha liten betydning, siden målingene ble gjort på fortynnete prøver. I følge Henriksen med flere (1994) kan overskudd av polymer i tillegg assosieres løst til dekkede liposomer slik at elektroforetisk mobilitet, og dermed også zetapotensialets absoluttverdi, øker. For å bekrefte at det målte zetapotensialet kunne relateres direkte til de pektindekkede liposomene, ble derfor overskuddet av pektin vasket vekk ved ultrasenterifugering.

Senterifugeringsprosessen som Henriksen med flere (1994) benyttet på kitosandekkede liposomer ble brukt som utgangspunkt for ultrasentrifugeringen. Betingelsene for prosessen ble imidlertid valgt på bakgrunn av forforsøkene. Ultrasentrifugeringshastigheten (35 000 rpm) for positive liposomer dekket med LM-pektin ble valgt fordi forforsøkene viste at høyere hastighet ga pellet som var vanskelige å resuspendere og lavere hastighet sannsynligvis ville gitt for stort tap av partikler. For HM- og amidert pektin var det vanskeligere å utvikle en

senterifugeringsprosess, da også kontrollrørene med bare pektinløsning fikk pellet. Pelletdannelsen i pektinløsningene kan skyldes at molekylvekten til HM- og amidert pektin var høyere enn LM-pektin (Tabell 6-1). Høyere molekylvekt øker sedimenteringshastigheten til polymerer (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005). En annen mulig forklaring er at pektinløsningene bestod av aggregater med høy totalvekt og dermed betraktelig høyere sedimenteringshastighet. Sentrifugeringshastigheten ble forsøkt redusert for å begrense sedimentertingstendensen, og økt temperatur og fortynning før sentrifugering ble forsøkt for å løse eventuelle aggregater.

Zetapotensiale til de pektindekkede liposomene endret seg lite ved ultrasenterifugeringen (Tabell 6-7). Dette styrker hypotesen om at det målte zetapotensialet skyldtes liposomer med adsorbert negativt pektin. I tillegg viser det at adsorbsjonsstyrken var tilstrekkelig til å tåle vaskeprosessen. Resultatet avviker fra funnene til Henriksen med flere (1994). Studiene deres viste at zetapotensiale til kitosandekkede liposomer sank fra +88 mV til +32 mV ved ultrasenterifugering (Henriksen, I. et al. 1994). Reduksjonen ble forklart med at løst assosierte kitosankjeder ble fjernet ved vaskingen, slik at elektroforetisk mobilitet, og dermed zetapotensiale, sank. En mulig forklaring på at funnene er forskjellig, er at de pektindekkede liposomene hadde så sterk negativ ladning at pektin i overskudd ble elektrostatisk frastøtet istedet for å assosiere seg til dem. Hvis så er tilfelle ville det ikke være noe løst assosiert pektin som kunne vaskes bort fra de pektindekkede liposomene ved ultrasentrifugeringen.

Partikkelstørrelse

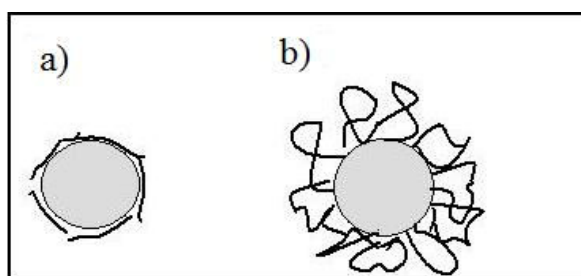
Endring i partikkelstørrelse er tidligere blitt brukt som indikasjon på dekking av liposomer med polymerer (Henriksen, I. et al. 1994; Laye, C. et al. 2008; Thirawong, N. et al. 2008). De positive liposomene (Tabell 6-3) hadde størrelser i området 135-170 nm med unimodale, smale fordelinger (PI 0,10-0,12). De pektindekkede positive liposomene hadde høyere partikkelstørrelse, 289, 268 og 397 nm og høyere polydispersitetsindeks 0,263, 0,403 og 0,663 for henholdsvis liposomer dekket med LM-, HM- og amidert pektin (Tabell 6-3). Polydispersitetsindeksene ligger innenfor

grensene for moderat polydispersitet, 0,08-0,7 (Morfesis, A. 2008). Økning i partikkelstørrelse kan i følge Thirawong med flere (2008) tyde på adsorpsjon av pektin til liposomene. Kompleksene de beskrev var imidlertid pektindekkede liposomer med høyere partikkelstørrelse enn det som ble funnet i denne oppgaven (800 -1200 nm) og høyere PI (tildels $>0,7$). Den foreslåtte strukturen til de beskrevde pektindekkede liposomene fra Thirawong med flere (2008) er liposomer heftet til pektinkjeder i store kompleks (Sriamornsak, P. et al. 2007).

Henriksen med flere (1994) fant også betraktelig høyere partikkelstørrelser (ca 600 nm) og bredere størrelsesfordelinger for liposomer dekket med kitosan enn det er funnet for pektindekkede liposomer i dette arbeidet. Ved dekkingen observerte de visuell aggregering, og at det var dannet store aggregater ble bekreftet ved cryoelektron miksokopi. Lave partikkelstørrelser og polydispersitetsindekser i dette arbeidet (Tabell 6-3), samt ingen visuell aggregering, kan tyde på at reaksjonen mellom pektin og positive liposomer skjedde uten aggregering. Det ble derfor vurdert som lite sannsynlig at det ble dannet ulike multikompleksstrukturer som beskrevet av Henriksen med flere (1994) og Sriamornsak med flere (2007). Mest sannsynlig struktur for de produserte kompleksene er enkeltliposomer dekket av pektin. Slike strukturer med lavere partikkelstørrelse er tidligere beskrevet for liposomer dekket med kitosan av blant andre Henriksen med flere (1997) og Laye med flere (2008). Endelig strukturavklaring for de pektindekkede liposomene krever mikroskopistudier.

De tre pektintypene ga pektindekkede positive liposomer av forskjellig partikkelstørrelse (Tabell 6-3). Positive liposomer dekket med HM-pektin var større enn positive liposomer dekket med LM- og amidert pektin. Struktur for adsorberte lag defineres vanligvis i termene "train", "loop" og "tail" (Lauten, R. A. 2004). "Train", eller flat adsorpsjon, representerer et polymersegment i fysisk kontakt med overflaten. "Loop" er segmenter av polymeren som buker seg ut i løsningen og fungerer som bindeledd mellom flatt adsorberte områder (Figur 7-1). "Tail" –haler- er ender av polymeren som strekker seg ut i løsningen. Hvilken adsorpsjonsform som dominerer påvirker tykkelsen og hvor kompakt det adsorberte laget er (Lauten, R. A.

2004). En mulig forklaring på forskjellen i størrelse mellom de pektindekkede liposomene er molekylvektsforskjellen. HM-pektin har høyere molekylvekt enn de andre pektintypene (Tabell 6-1). Ved økt molekylvekt er kjedene lengre (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005). Det er mulig at kjedene da i større grad ble adsorbert i form av looper og mindre ved flat adsorbsjon. Tilsvarende effekt av molekylvekt på andelen polymer adsorbert som loop, er også beskrevet for adsorbsjon av kitosanpolymerer av ulik molekylvekt til negative lipidmiceller (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1994). En annen mulig forklaring er forskjellen i dissosieringsgrad mellom polymerene. HM-pektin er mindre negativt ladet enn de andre pektintypene, slik også zetapotensiale viste (Tabell 6-5). I følge Guzey med flere (2006) kan mindre ladning medføre at en større andel av kjedene adsorberer som looper, fordi kjedene da kveiler seg sammen. Det har tidligere blitt vist at jo mer ladet en polymer er, jo flatere vil den adsorbere til en partikkeloverflate (Claesson, P. M. og Ninham, B. W. 1992).



Figur 7-1: Adsorbsjon av polymerer til partikler kan skje i form av a) flat polymeradsorbsjon og b) polymeradsorbsjon i looper (Lauten, R. A. 2004).

Partikkelstørrelsesmålinger av pektinløsningene ble utført for å undersøke om de målte størrelsesendringene ved dekking kunne skyldes at målingene ble forstyrret av størrelsen til pektinmolekyler eller aggregater. Partikkelstørrelse (PI) for 0,2 % (w/w) løsninger av henholdsvis LM-, HM- og amidert pektin målt ufortynnet var 520 nm (0,91), 636 nm (0,88) og 948 nm (0,86). Thirawong med flere (2008) oppgir partikkelstørrelsen (PI) for henholdsvis LM-, HM- og amidert pektin til 592,8 (0,78), 549 (0,79) og 303 (0,7). Det er vanskelig å sammenlikne resultatene, da det i artikkelen ikke er oppgitt hvilke konsentrasjoner løsningene hadde og hvilken fortynning som ble gjort før måling. Likevel er det felles for resultatene at polydispersitetsindeksene var høyere enn 0,7, slik at fordelingene regnes som svært polydisperse (Morfesis, A.

2008). Count rate for 0,2 %(w/w) løøsningene var høyere for løøsninger av HM- og amidert pektin enn for LM-pektin (Tabell 6-6). Dersom count rate representerer telling av aggregater, kan dette bety at LM-pektin hadde en mindre tendens til å aggregere i det aktuelle løøsemidlet enn de to andre pektintypene. Dette sammenfaller også med grafene for zetapotensialene (Figur 6-4, Figur 6-5 og Figur 6-6), der toppen for LM-pektin ble splittet opp ved mindre fortynning (høyere konsentrasjon ved måling) enn amidert pektin og HM-pektin. Hypotesen styrkes av den svært lave hugginskonstanten til LM-pektin i fosfatbufferen (Tabell 6-2), som kan bety at polymeren var utstrakt og ladet og dermed ikke i stand til å aggregere i vesentlig grad.

Ved fortynning før måling sank count rate ved størrelsesmålingen drastisk for alle pektintypene. Målingene måtte avbrytes etter ett av tre run, fordi count rate var under 50 KCps og dermed for lav for PCS-metoden (Morfeis, A. 2008).

Partikkelstørrelsene var svært høye og polydispersitetsindeksene 1. Disse resultatene kan tolkes enten som en ren fortynningseffekt: De samme aggregatene som kunne måles ufortynnet var fremdeles tilstede, men nå ved så lav konsentrasjon at de ikke kunne måles, eller som en løøselighetseffekt: Ved fortynning ble aggregatene løøst opp og dermed ikke mulige å telle.

Ved sammenlikning av partikkelstørrelsen til pektinløøsningene og de pektindekkede positive liposomene, kom det fram at de pektindekkede liposomene hadde lavere partikkelstørrelse (200-400 nm) og smalere størrelsesfordeling (PI 0,2-0,5). Dette gjør det lite sannsynlig at de målte størrelsene til pektindekkede liposomer skyldes elektrostatisk bundete aggregater av pektin og flere liposomer: Et slikt tilfelle ville antageligvis heller ha gitt svært høye partikkelstørrelser, og størrelsesfordelingen til slike komplekser kunne forventes å være bred (PI>0,7). Som diskutert ovenfor er slike produkter beskrevet av andre tidligere (Henriksen, I. et al. 1994; Sriamornsak, P. et al. 2007). Sammenlikningen viste også at det ikke var sannsynlig at partikkelstørrelsene målt for pektinløøsningene skyldtes enkelte pektinmolekyler, fordi partikkelstørrelsene til de pektindekkede liposomene da ville vært mye høyere.

De målte pektindekkede liposomene kunne hypotetisk sett også forklares som et gjennomsnitt av store pektinaggregater og frie liposomer. Dette vurderes som usannsynlig fordi pektinløsningenes count rate sank betydelig ved fortynning, og fordi størrelsesfordelingene for pektinløsningene var svært brede. Altså ble de målte partikkelstørrelsene vurdert til å mest sannsynlig skyldes dekkede positive liposomer.

Prøven der positive liposomer var dekket med 0,005 % (w/w) HM-pektin skilte seg ut med høy partikkelstørrelse (934 nm) og høy PI (0,91). Dette kan ha en sammenheng med at mengden pektin var for lav til å dekkede liposomene. Istedet kan en flokkulering ha funnet sted. Flokkuleringsproblematikken er diskutert under del 2.

Sammenlikningen av pektinløsninger og pektindekkede positive liposomer indikerte at pektinløsningenes egenskaper ikke alene forårsaket de målte størrelsesøkningene ved dekkingen. Den observerte økningen i partikkelstørrelse kunne likevel være en effekt av at pektin i overskudd økte viskositet ved partikkelstørrelsesmåling (Morfesis, A. 2008). Fjerning av overskuddspektin ved ultrasenterifugering var nødvendig for å avklare om størrelsesøkningen bare var en viskositetseffekt.

Pektindekkede liposomer med alle de tre pektintypene viste størrelsesøkning ved ultrasenterifugeringen. Økningen var 89, 64 og 30 nm for henholdsvis LM-, amidert og HM-pektin (Tabell 6-7). Økning i partikkelstørrelsene når overskuddet av pektin ble fjernet, tyder på at den målte økningen i partikkelstørrelse ved dekkingen ikke var et resultat av økt viskositet ved måling. En logisk forklaring på størrelsesøkningen ved vaskingen, er at sentrifugeringsprosessen økte mengden pektin adsorbert til liposomene. Forklaringen er noe usikker, fordi det adsorberte negative pektinet antageligvis hindrer ytterligere pektinadsorpsjon ved elektrostatisk frastøtning (Guzey, D. og McClements, D. J. 2006). Det er imidlertid mulig at den høye sentrifugeringskraften overgikk den elektrostatiske frastøtningen. En annen mulig forklaring er at kjedenes konformasjon, eller adsorpsjonsmåte, ble endret når overskuddet av pektin ble vasket vekk. Kjedenes konformasjon er i følge Guzey med flere (2006) avhengig av miljøfaktorer. Pektin i overskudd kan ha påvirket miljøet rundt de pektindekkede liposomene, og dermed også kjedenes konformasjon.

7.2.2 Dekking av negative liposomer

For de negative liposomene ble zetapotensiale mindre negativt etter dekkningen (Tabell 6-4). Zetapotensialene lå for hver pektintype nært zetapotensialene til de pektindekkede positive liposomene (Tabell 6-4 og Tabell 6-3). Dette kan bety at de negative liposomene ble dekket og fikk pektinets ladning, men det kan også bety at pektinets zetapotensiale maskerte zetapotensialet til de negative liposomene.

Ved fortynning av de pektindekkede negative liposomene, ble det målte zetapotensialet splittet opp i mange topper (Figur 6-7). Grafen liknet grafene for pektinløsningenes zetapotensiale (Figur 6-4 b, Figur 6-5 b og Figur 6-6 b). På bakgrunn av dette er det rimelig å anta at det målte zetapotensialet var de løse pektinaggregatenes zetapotensiale, som igjen overskygget liposomenes zetapotensiale. De negative pektindekkede liposomene hadde selv ved lite fortynning en bredere fordeling i zetapotensialene enn både pektinløsningene og de pektindekkede positive liposomene (Tabell 6-5). En mulig forklaring på dette er at pektinaggregatene og liposomenes zetapotensiale var forskjellige og således sammen gjorde fordelingene bredere.

Partikkelstørrelsene til de dekkede negative liposomene var betraktelig lavere enn for de pektindekkede positive liposomene (Tabell 6-4 og Tabell 6-3). Partikkelstørrelsen ble endret fra 153 til 155 nm ved dekking med LM-pektin, noe som ikke kan betraktes som en størrelsesøkning. For liposomer dekket med HM-pektin og amidert pektin var partikkelstørrelsene høyere, henholdsvis 176 og 175 nm. Til sammenlikning var positive liposomer dekket med HM- og amidert pektin 397 og 269 nm. Forskjellen mellom de dekkede positive og de dekkede negative liposomene var så stor at det er lite sannsynlig at de negative liposomene ble dekket. Størrelsesøkningen ved dekking av negative liposomer med pektin kan skyldes andre faktorer, som for eksempel at viskositeten under måling var økt. At dette ikke skjedde med LM-pektin, kan skyldes den lave viskositeten LM-pektin hadde i fosfatbufferen sammenliknet med HM- og amidert pektin (Tabell 6-2).

Til tross for at de fleste studier av polymerdekking tidligere er gjort med polymerer og liposomer av motsatt ladning, har også lik ladning vært benyttet (Jain, A. K. et al. 2007). I deres studie ble negative multivesikulære liposomer dekket med den negative polymeren karbopol. Forfatterne beskriver bindingen som hydrogenbindinger og van der Waals bindinger. At en slik dekking ikke skjedde i dette arbeidet, kan skyldes at den elektrostatiske repulsjonen var vesentlig større enn de tiltrekkende kreftene. Det kan ikke utelukkes at negative liposomer kan dekkles med pektin ved svake bindinger dersom mengde negativt lipid reduseres.

Sammen gir resultatene stor grunn til å anta at de negative liposomene ikke ble dekket av pektin. Dekking av negative liposomer ble derfor ikke undersøkt videre.

7.2.3 Reproduserbarhet av dekkingsmetoden ved høy og lav tilsetningshastighet

Det var planlagt å benytte tilsetningshastighet ved produksjon som en variabel prosessfaktor i senere faktorforsøk. Reproduserbarheten av metoden ble derfor undersøkt både ved høyt og lavt nivå av tilsetningshastigheten.

Det ble valgt å gjøre reproduserbarhetsstudien for dekking av positive liposomer med 0,05 % (w/w) LM-pektin. Tilsetningsrekefølge, lipidkonsentrasjonen og mengde ladet lipid ble holdt på nivåene fra tidligere forsøk.

Slangepumpens reproduserbarhet ved ulike pumpehastigheter var testet på destillert vann i forforsøk. Tilsetningshastighet for undersøkelse av metodens reproduserbarhet ble satt til to nivåer med tilnærmet maksimal spredning innen det området hvor slangepumpen kunne pumpe reproduserbart. Dette var 7 rpm ($\approx 1,2$ ml/min) og 38 rpm ($\approx 5,5$ ml/min).

Partikkelstørrelse var den responsen som varierte mest, og den ble derfor brukt for vurdering av reproduserbarheten. Det ble utført 4 replikater ved hver tilsetningshastighet. Dette var få replikater, men det var likevel mulig å beregne relativt standardavvik for å få et inntrykk av om metoden hadde en akseptabel

reproduserbarhet. For tilsetningshastighet 7 rpm og 38 rpm var relativt standardavvik i partikkelstørrelsen 1,2 % og 1,4 %. Dette vurderes som en god reproduserbarhet. Metoden ble derfor vurdert som reproduserbar ved begge nivåene av tilsetningshastigheten.

Vaskingen av de pektindekkede liposomene (Tabell 6-9) bekreftet trenden sett under verifiseringen av dekkingen: Partikkelstørrelsen økte signifikant ved fjerning av overskuddspektin ($p < 0,0005$), mens for zetapotensiale var det ingen signifikant endring.

7.2.4 Oppsummering del 1

Del 1 har vist at det for alle pektintypene er mulig å produsere ikke-aggregerte pektindekkede liposomer, dersom liposomene er positive. Verifiseringen av konseptet baserer seg på dannelsen av produkter med motsatt ladning og høyere partikkelstørrelse enn utgangsliposomene. Størrelsesfordelingene var innen grensen for moderat polydispersitet. Disse resultatene kunne ikke forklares ut fra pektinløsningenes egenskaper alene og var tilstede også når overskudd av pektin var vasket vekk.

Det ble også vist at de tre pektintypene ga ulike produkter med hensyn til partikkelstørrelse og zetapotensiale.

Videre ble det bekreftet at metoden hadde en tilfredsstillende reproduserbarhet ved høyt og lavt nivå av tilsetningshastighet for liposomer til pektinløsningene.

Negative liposomer lot seg ikke dekke på grunn av elektrostatisk frastøtning til negativt ladet pektin.

7.3 Del 2: Undersøkelse av utvalgte prosess og formuleringsfaktorerens betydning for produktets egenskaper.

Del 2 av oppgaven var en undersøkelse av utvalgte prosess- og formuleringsfaktorerens betydning for produktets egenskaper ved dekking av liposomer med pektin. Da dette var en multivariat situasjon, ble statistisk forsøksdesign anvendt som et verktøy i alle forsøkene. Først ble to screeningsstudier utført. Hensikten med disse var å undersøke hvilke faktorer som hadde en signifikant påvirkning på produktets egenskaper.

Deretter ble det utført en optimaliseringsstudie for utvalgte signifikante faktorer, for å lage modeller som kunne brukes til prediksjon av egenskapenes verdi for fremtidige prøver. Det ble valgt å gjøre undersøkelsene for dekking av positive liposomer med LM-pektin. Resultatenes relevans for HM- og amidert pektin ble vurdert kort avslutningsvis.

Responsmålene i del 2 var karakteristika som det er nødvendig å kunne kontrollere for å produsere homogene produkter med akseptabel stabilitet og ønskede egenskaper. Zetapotensiale ble valgt som responsmål fordi det kan påvirke partiklenes stabilitet (Morfesis, A. 2008) og være av betydning for evne til mukoadhesjon (Yang, X. og Robinson, J. R. 1998). *Endring* i partikkelstørrelse ved dekking ble valgt som respons framfor pektindekkede liposomers partikkelstørrelse. Begrunnelsen for dette er at liposomene hadde ulik størrelse før dekkingen. Teoriene for struktur til stabile dekkede liposomer/kolloider, er at disse er dekket fullstendig av ett eller flere lag polymer (McClements, D. J. 2005; Laye, C. et al. 2008) og at ulike variable faktorer påvirker egenskapene til laget/lagene, som foreksempel tykkelsen (Guzey, D. og McClements, D. J. 2006). Korrigering for liposomenes variasjon ga et estimat for lagets tykkelse. Variasjonen i liposomenes størrelse kan likevel være et problem, fordi studier har vist at liposomstørrelsen kan ha betydning for produktet ved polymerdekking (Mobed, M. og Chang, T. M. 1998). Mobed med flere (1998) benyttet imidlertid liposomer med større forskjell i partikkelstørrelse (220-450 nm) enn variasjonen mellom liposomene benyttet her (121-214 nm).

Måling av partikkelstørrelse med PCS er en tidkrevende prosess. Det ble derfor undersøkt om turbiditeten og partikkelstørrelsen var tilstrekkelig korrelert til at endring i partikkelstørrelsen kunne estimeres ved hjelp av endring i turbiditet. Turbiditet har blitt brukt som mål på grad av flokkulatdannelse mellom kitosan og lipidmiceller tidligere (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993). Bølgelengden for turbiditetsmåling, 550 nm, ble valgt på bakgrunn av absorpsjonsmaksimum for liposomsuspensjonen. Romøren med flere (2002) benyttet 500 nm til å måle turbiditet på interaksjonen mellom positive liposomer og negativt mucin. R^2 for regressjonen mellom partikkelstørrelse og turbiditet var 0,3326 (Figur 6-8). Dette betyr at variasjonen i turbiditet kunne forklare 33,3% av variasjonen i partikkelstørrelsen. Til bruk som estimat og eventuelt til kvalitetskontroll ble dette vurdert som for lav korrelasjon.

7.3.1 Om faktorforsøkene

Valg av faktorer

Tilsetningsrekkefølge for blanding av liposomer med polymer hadde betydning for grad av aggregering ved dekking av liposomer med kitosan (Henriksen, I. et al. 1994). Det ble derfor valgt å undersøke denne prosessfaktorens effekt ved dekking av liposomer med pektin.

Tilsetningshastigheten benyttet i del 1, 38 rpm, var valgt noe tilfeldig. For dekking av liposomer med kitosan ble denne prosessfaktoren funnet av betydning (Henriksen, I. et al. 1997). Det var ønskelig å avklare faktorens effekt ved dekking av liposomer med pektin. 38 rpm (5,5 ml/min) og 7 rpm (1,2 ml/min) ble valgt som henholdsvis høyt og lavt nivå. Nivåene ble valgt på bakgrunn av at metoden ble funnet reproducerbar ved disse tilsetningshastighetene i kap 6.2.3. Disse nivåene ligger noe høyere enn de som Henriksen med flere (1997) undersøkte for dekking med kitosan, 0,23 ml/min og 0,93 ml/min.

Det er vist at fasetilstand av liposomsuspensjonen har betydning for adsorpsjon av liposomer til celler (Szoka, F. et al. 1980). Det er mulig dette også gjelder for adsorpsjon av pektin til liposomer. Fasetilstanden ble derfor inkludert som en mulig formuleringsfaktor.

Thirawong med flere (2008) undersøkte dekking av liposomer med pektinløsninger i området 0,2 - 1% (w/w). Det ble derfor valgt å undersøke effekten av pektinkonsentrasjonen i dette området. Siden formuleringsfaktorens effekt der viste seg å være usikker, ble det besluttet å undersøke ned til 0,05 %(w/w). I del 1 av oppgaven ga dekking av liposomer med pektin ned til 0,05 %(w/w) produkter som ikke aggregerte for alle pektintypene.

Lipidkonsentrasjonen i liposomsuspensjonen var en formuleringsfaktor som i del 1 ble holdt på et relativt lavt nivå, 3mM. Anvendte lipidkonsentrasjoner for legemiddelformuleringer er blant annet 10 mM for en generell mukosal formulering (Boulmedarat, L. et al. 2005) og 25 mM for lokalbehandling av sår i oral mukosa (Erjavec, V. et al. 2006). Effekten av å øke konsentrasjonen til 10 mM ble derfor undersøkt.

Drivkraften for adsorpsjonen ser ut til å være elektrostatisk i følge resultatene i del 1 i dette arbeidet, samt annen litteratur (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993; Mobed, M. og Chang, T. M. 1998; Takeuchi, H. et al. 2003; Sriamornsak, P. et al. 2007). Det var derfor ønskelig å vurdere effekten av mengde ladet lipid i liposomsuspensjonen. Nivået av formuleringsfaktoren i del 1, 10 mol%, var valgt på bakgrunn av litteratur for dekking av liposomer med den positivt ladete polymeren kitosan (Henriksen, I. et al. 1994; Henriksen, I. et al. 1997). Tidligere undersøkelser av dekking med pektin er gjort med ca 2 mol% ladet lipid (Sriamornsak, P. et al. 2007; Thirawong, N. et al. 2008). For å kunne sammenlikne resultater med disse forfatterne, ble 2 og 10 mol% ladet lipid valgt som henholdsvis lavt og høyt nivå.

Forsøksstrategi og valg av forsøksoppsett

Screeningen ble startet med et fullfaktorielt forsøk med 3 faktorer:

1) Tilsetningsrekkefølge, 2) Fasetilstand av lipidene i liposomsuspensjonen og 3) Pektinkonsentrasjonen i området 0,2-1 % (w/w). Dette ble gjort for å øke kunnskapen om systemet og for eventuelt å kunne holde de kategoriske faktorene konstante i senere forsøk.

For å avdekke flere betydningsfulle faktorer, ble det satt opp et redusert faktorforsøk. Dette ga en mer forsøksøkonomisk screening. Det gjenstod fire faktorer å undersøke:

1) Pektinkonsentrasjon i området 0,05-0,2 % (w/w), 2) Lipidkonsentrasjon, 3) Tilsetningshastighet og 4) mengde ladet lipid. Det ble derfor satt opp et 2^{4-1} redusert faktorforsøk.

På bakgrunn av fullfaktorforsøket ble tilsetningsrekkefølge og fasetilstand for lipidene i liposomsuspensjonen satt til et konstant nivå før videre undersøkelse av systemet. Det reduserte faktorforsøket, 2^{4-1} -designet, viste at lipidkonsentrasjonen var av betydning for endring i partikkelstørrelse, og at mengde ladet lipid og pektinkonsentrasjonen var av betydning for zetapotensiale til de pektindekkede liposomene (diskuteres nedenfor). Optimaliseringsdesignet ble utviklet for å undersøke disse tre faktorene på flere enn to nivåer. Dette ga mulighet for å analysere resultatene med en mer kompleks modell, som kan brukes til prediksjon av responsvariablene i fremtidige prøver. I tillegg skulle modellen gi bedre forståelse av systemet (Guyot, D. 2006, s. 361-447).

Optimaliseringsforsøket skulle lages ved å utvide det reduserte faktorforsøket, for å utnytte de utførte forsøkene best mulig. Central composite design var da et egnet design (se kap 2.5.2). Utvidelsen forutsetter at variabler som ble variert i sceeningen og ikke skulle varieres i optimaliseringen måtte holdes konstant på sitt lave eller høye nivå (Guyot, D. 2006, s. 361-447). Tilsetningshastigheten ble derfor holdt på sitt lave nivå, 7 rpm.

Lavt nivå av pektinkonsentrasjonen og mengden ladet lipid var allerede så lave at det ikke var ønskelig å redusere disse ytterligere. Stjernepunktene i vanlige central composite design ble derfor skjøvet inn til å ligge på sideflatene i kuben som forsøksrommet til de tre faktorene utgjorde. Ulempen er at kun tre nivåer av faktorene ble undersøkt, i motsetning til fem i vanlige central composite design (Guyot, D. 2006, s. 361-447). Forsøket kunne likevel analyseres med kvadratisk modell og avdekke eventuelle krummniger i effektene.

Utvikling av optimaliseringsdesignet

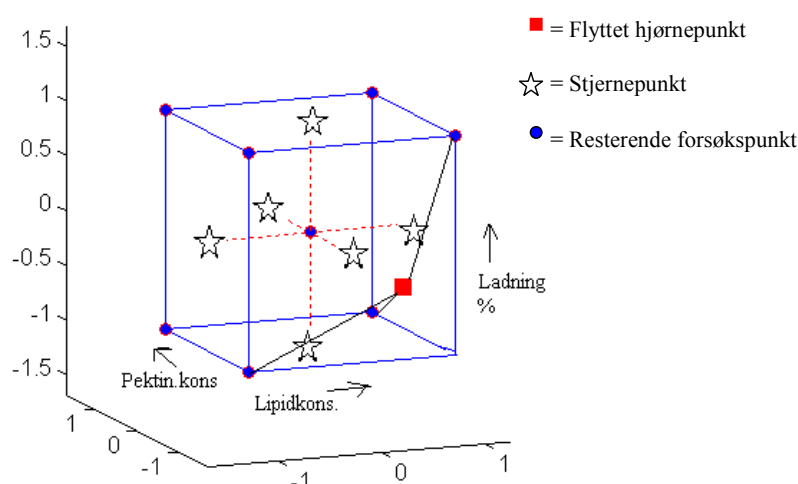
I det reduserte faktorforsøket kom det fram at kombinasjonen med høy lipidkonsentrasjon, høy tilsetningshastighet, lav pektinkonsentrasjon og lav mengde ladet lipid ga aggregerte produkter med vesentlig høyere partikkelstørrelse og polydispersitetsindeks enn de resterende prøvene (Tabell 6-11). I central composite designet ville dette punktet utgjort et hjørne i forsøksrommet. Det var derfor viktig å finne en alternativ måte å produsere punktet på, som ikke medførte aggregering.

Det første forforsøket undersøkte om det var tilstrekkelig å redusere tilsetningshastighet til sitt lave nivå, da dette uansett skulle gjøres i de andre forsøkspunktene i central composite designet. Resultatet av forforsøket var høy partikkelstørrelse og PI, samt sedimentering av produktet over natt. Dette tydet på fremdeles aggregering. Resultatet var som forventet, da tilsetningshastigheten ikke kom ut som en signifikant faktor i screeningen.

På bakgrunn av første forforsøk ble det klart at forsøksrommet måtte begrenses. En slik situasjon hvor ikke alle kombinasjoner av faktorene er mulig, kalles en multilinear begrensning (Guyot, D. 2006, s. 447-489). I det andre forforsøket ble tre punkter for en trekant som begrenset forsøksrommet sammenliknet med ett punkt liggende lenger ut i det problematiske hjørnet. Bare punktet med 8,25 mM lipid, 0,0875% (w/w) pektin og 4% ladet lipid ga produkt som trolig ikke var aggregert. Begge prøvene som ble produsert for å utgjøre hjørnene i den tenkte trekanten hadde

høye partikkelstørrelser og PI, lave zetapotensiale og sedimenterte i hetteglassene over natt.

På bakgrunn av forforsøkene ble det besluttet å utføre optimaliseringsforsøket med punktet 8,25 mM lipid, 0,0875 %(w/w) LM-pektin og 4% ladet lipid i stedet for det problematiske hjørnepunktet. Området av forsøksrommet som ikke ble dekket av forsøkspunktene var da relativt stort (Figur 7-2). Årsaken til dette er at ikke alle hjørner av det ugunstige området ble undersøkt (Guyot, D. 2006, s. 447-489). Det ville imidlertid ikke latt seg gjøre å undersøke alle hjørnene, da forforsøkene viste at punkter med ytterverdi (-1 eller +1) av to faktorer aggregerte.



Figur 7-2: Figuren viser det endelige central composite designet for optimalisering av formuleringen til pektindekkede liposomer. De optrukne linjene inne i forsøksrommet viser området som ikke ble undersøkt.

For å kontrollere variasjonen mellom det reduserte faktorforsøket (2^{4-1} -designet) og optimaliseringsdesignet, ble de tre nye senterpunktene sammenliknet med referanseprøvene fra 2^{4-1} -designet. Sammenlikning av punktene ble gjort både ved to utvalgs t-test (parametrisk) og Mann-Whitney test (ikke-parametrisk), fordi parametriske tester kan være problematisk når så få prøver foreligger med mindre prøvene med sikkerhet er normalfordelt (Moore, D. og McCabe, G. P. 2003).

Ingen av testene viste signifikant forskjell i størrelsesendringen på signifikansnivå $\alpha=0,05$. For zetapotensiale viste t-testen signifikant forskjell ($p<0,05$), noe Mann-Whitney testen ikke gjorde. Da forskjellen i størrelsesendring ikke var signifikant i

noen av testene, og en eventuell forskjell i zetapotensialet var lav (1,067 mV) ble senterprøvene og referanseprøvene vurdert som akseptabelt like til at hjørnepunkter og stjernepunkter kunne analyseres sammen som et forsøk.

7.3.2 Faktorenes betydning for størrelsesendring og zetapotensiale

Faktorenes betydning for zetapotensiale

Forsøk på å modellere zetapotensiale til de pektindekkede liposomene fra fullfaktorforsøket med PLS-1, ga ikke noen god modell. Dette betyr at det i forsøket ikke var mulig å se noen betydning av **tilsetningsrekkefølgen** og **type hovedlipid** for zetapotensiale. Det ble konkludert med at faktorene ikke påvirket zetapotensiale i det aktuelle systemet.

Mengde ladet lipid hadde signifikant effekt på zetapotensiale ved screeningen med det reduserte faktorforsøket (Figur 6-12). Økende mengde ladet lipid ga mer negativt zetapotensiale for de pektindekkede liposomene. Som nevnt tidligere, kan det antas at drivkraften for adsorpsjonen er elektrostatisk (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993; Mobed, M. og Chang, T. M. 1998; Takeuchi, H. et al. 2003; Sriamornsak, P. et al. 2007). Hvis dette er tilfellet, kan faktorens betydning for zetapotensiale skyldes en økt drivkraft for fullstendig metning av liposomoverflaten med pektin. Da alle designprøvene inkludert i modelleringen mest sannsynlig var enkeltliposomer dekket med pektin, kan effekten bety at ved sterk liposomladning dekkes overflaten ytterligere enn hva som er nødvendig for å hindre aggregering/stabilisere produktet. I følge Guzey med flere (2006) er det imidlertid ikke sannsynlig at flere lag pektin ble adsorbert, da uadsorbert pektin ville frastøtes de dekkede liposomene på grunn av deres negative ladning. Også ultrasentrifugeringen av pektindekkede liposomer i del 1 av oppgaven kan tyde på at det ikke var adsorbert flere lag pektin, siden zetapotensiale ikke ble mindre negativt ved vaskingen (

Tabell 6-7). Den observerte effekten av faktoren sammenfaller med andre studier der økt mengde ladning i liposomene har vist økt reaksjon mellom liposomer og polymer (Takeuchi, H. et al. 2003).

I optimaliseringsdesignet ble det ytterligere bekreftet at økt mengde ladet lipid ga mer negativt zetapotensiale (Tabell 6-15). Effekten var av samme størrelsesorden som effekten av pektinkonsentrasjonen, og det var disse to effektene som hadde størst betydning på zetapotensiale (Figur 6-14).

Økning av **pektinkonsentrasjonen** fra 0,05 til 0,2 %(w/w) ga mer negativt zetapotensiale i screeningen med det reduserte faktorforsøket (Figur 6-12). Effekten av faktoren var ikke signifikant. Trenden var likevel tydelig ut fra usikkerhetsgrensene til regresjonskoeffisienten. Pektinkonsentrasjonen i dette området ble derfor undersøkt videre i optimaliseringsdesignet. ANOVA-tabellen viste at effekten var signifikant ($p < 0,00005$, Tabell 6-15). Effekten var, som også det reduserte faktorforsøket viste, at økende pektinkonsentrasjon ga mer negativt zetapotensiale. pH i pektinløsningen var en variabel faktor som må tas med i betraktning. Undersøkelse av pH i pektinløsningene i etterkant av forsøket viste at pH ved konsentrasjonene 0,2, 0,125 og 0,05 %(w/w) var henholdsvis 4, 5 og 6.6 (Se vedlegg 4). Dette betyr at bufferkapasiteten til fosfatbufferen ikke var stor nok. pH-variasjonen i løsningene kan ha medført ulik dissosiering og dermed ulik ladning på pektinmolekylene (Thakur, B. R. et al. 1997). Dersom pektinets dissosieringsgrad sank ved økende konsentrasjon fordi pH i løsningene sank, skulle man kunne forvente at økt pektinkonsentrasjon ville gjøre zetapotensiale mindre negativt. En slik effekt av pH i løsningen er observert for negative liposomer dekket med kitosan (Henriksen, I. et al. 1997; Takeuchi, H. et al. 2003). Siden effekten i dette arbeidet var motsatt, er trolig ikke pH-variasjonen av vesentlig betydning for variasjonen i zetapotensiale.

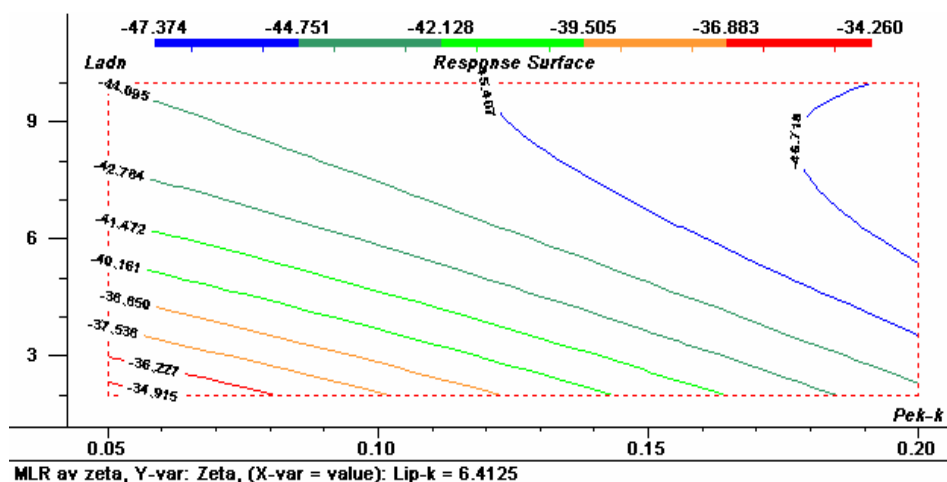
Laye med flere (2008) observerte en tilsvarende effekt på zetapotensiale for kitosankonsentrasjonen ved dekking av liposomer. Zetapotensiale økte sakte ved økende konsentrasjoner av kitosan, selv ved konsentrasjoner over stabiliserende konsentrasjon (Laye, C. et al. 2008). Som diskutert under betydningen av mengde

ladet lipid, kan dette skyldes en mer fullstendig dekket overflate. I sin teoretiske vurdering av polyelektrolyttstabiliserte kolloide systemer, beskriver imidlertid McClements med flere (2005) hvordan systemet kun er stabilisert når partikkeloverflatene er fullstendig dekket. Ved ytterligere økning i polyelektrolyttkonsentrasjon vil det i følge teorien ikke adsorberes mer. En slik teori er vanskelig å forene med resultater der absoluttverdien av zetapotensialet fortsetter å øke over konsentrasjoner av polymer som er tilstrekkelige til å stabilisere systemet.

Ved dekking av liposomer med LM-pektin observerte Thirawong med flere (2008) at zetapotensiale ble svakt mer negativt ved økning av pektinkonsentrasjonen fra 0,1 til 0,3 %(w/v). Ved ytterligere konsentrasjonsøkning flatet reduksjonen i zetapotensiale ut. I det reduserte faktorforsøket (2^{4-1} -design) og optimaliseringsdesignet ble det benyttet løsninger fra 0,05 til 0,2 %(w/w). Dette ligger innenfor området hvor Thirawong med flere (2008) fant at zetapotensiale ble mer negativt, men da lipidkonsentrasjonen ikke er oppgitt er det vanskelig å sammenlikne resultatene. Nødvendig mengde pektin for å dekke liposomene vil være avhengig av antall liposomer å dekke. Sett sammen gir forsøkene likevel grunn til å anta at det også for pektin finnes en fullstendig metningskonsentrasjon. Den observerte effekten av pektinkonsentrasjonen kan således bety at for liposomkonsentrasjoner på 3 og 10 mM er den fullstendige metningskonsentrasjonen høyere enn 0,05 %(w/w). Effekten av å øke pektinkonsentrasjonen fra 0,05 til 0,2 %(w/w) er da som forventet. I screeningen av konsentrasjonsområdet 0,2-1 %(w/w) ble det på den andre siden ikke funnet effekt av pektinkonsentrasjonen (fullfaktorforsøket, kap 6.3.1). Dette kan skyldes at forsøket ikke var egnet til å avdekke effekten. Mer sannsynlig er det imidlertid at fullstendig metningskonsentrasjon av pektin var passert for det aktuelle systemet. Dersom 0,2 %(w/w) pektin var tilstrekkelig til å dekke liposomoverflaten fullstendig, var det som forventet at faktoren ikke fikk signifikant effekt ved økning til 1 %(w/w).

I optimaliseringsdesignet ble det også funnet signifikant effekt på zetapotensiale for annengradsleddet til mengde ladet lipid, **ladn**2** og interaksjonen mellom mengde ladet lipid og pektinkonsentrasjonen, **ladn*pek-k** (henholdsvis $p=0,0001$ og

$p < 0,00005$, Tabell 6-15). Effektene var mindre enn hovedeffekten av mengde ladet lipid og positive. Dette betyr at de to effektene gjorde zetapotensiale mindre negativt. Responsflaten for pektinkonsentrasjonen og mengde ladet lipid kan gi forståelse av effektene $ladn^{**2}$ og $ladn*pek$ (Figur 7-3).



Figur 7-3: Responsflate for effekten av pektinkonsentrasjonen (pek-k) og mengde ladet lipid (ladn) på zetapotensialet i optimaliseringsdesignet.

Avstanden mellom responsflatelinjene for mengde ladet lipid ble større ved økende mengder (Y-aksen). Dette betyr at effekten avtok. Årsaken kan være leddet $ladn^{**2}$, som hadde en positiv regresjonskoeffisient. En mulig forklaring er at økende drivkraft for tett adsorpsjon i form av økende liposomladning, gjorde zetapotensiale mer negativt inntil et platå hvor liposomoverflaten ikke kunne tettes ytterligere. Det er mulig at ytterligere økning av mengde ladet lipid kan resultere i mindre negativt zetapotensiale, fordi pektinet da ikke har nok ladete grupper til å nøytralisere liposomladningen (Guzey, D. og McClements, D. J. 2006). Det er også foreslått at økt ladningstetthet på partikler gir jevner adsorpsjon av polymerkjeder på grunn av flere adsorpsjonspunkter (Gregory, J. 1973). Dette kan også være en forklaring på effekten av mengde ladet lipid, dersom jevnere pektinadsorpsjon også medførte tettere og mer fullstendig adsorpsjon. $ladn^{**2}$ kan da forklares med at ved høye ladningstettheter ble pektinet allerede adsorberte så jevnt og tett som mulig.

Den positive effekten $ladn*pek-k$ vises også i responsflaten (Figur 7-3). Her framkommer det at økende pektinkonsentrasjon gjorde zetapotensiale mer negativt,

men at effekten var størst ved lav mengde ladet lipid. Tilsvarende var effekten av mengde ladet lipid størst ved lav pektinkonsentrasjon. Dette styrker hypotesen om at begge disse faktorene virket som drivkraft for å tette liposomoverflaten fullstendig med pektin: Dersom den ene faktoren var høy kunne den alene gi tilstrekkelig drivkraft.

For å oppnå mest mulig negativt zetapotensiale, bør man kombinere høye mengder ladet lipid med høye konsentrasjoner av pektin. Dette kan gi god elektrostatisk stabilisering av systemet (Morfesis, A. 2008). Pektinkonsentrasjonen kan imidlertid ikke økes uendelig, da konsentrasjoner av pektin $>C_{\text{dep}}$ kan gi ”depletion flokkulering”, det vil si osmotisk diffusjon av vann ut i løsningen slik at dekkede liposomer flokkulerer (McClements, D. J. 2005). C_{dep} for det undersøkte systemet av pektindekkede liposomer er ikke kjent.

Lipidkonsentrasjonen hadde ikke signifikant effekt på zetapotensiale i screeningen med det reduserte faktorforsøket (Figur 6-12). I optimaliseringsdesignet, derimot, ble det funnet at økning i lipidkonsentrasjonen medførte mindre negativt zetapotensiale ($p=0,0051$, Tabell 6-15). En logisk forklaring på dette, sett sammen med effekten av de andre faktorene, er at ved økt lipidkonsentrasjon ble dekkingsgraden for liposomoverflatene mindre på grunn av at et større samlet areal måtte dekkes. Til dette bør det bemerkes at effekten trolig er av begrenset praktisk betydning, fordi t-verdien til regresjonskoeffisienten var liten sammenlikent de andre faktorene i modellen (Figur 6-14).

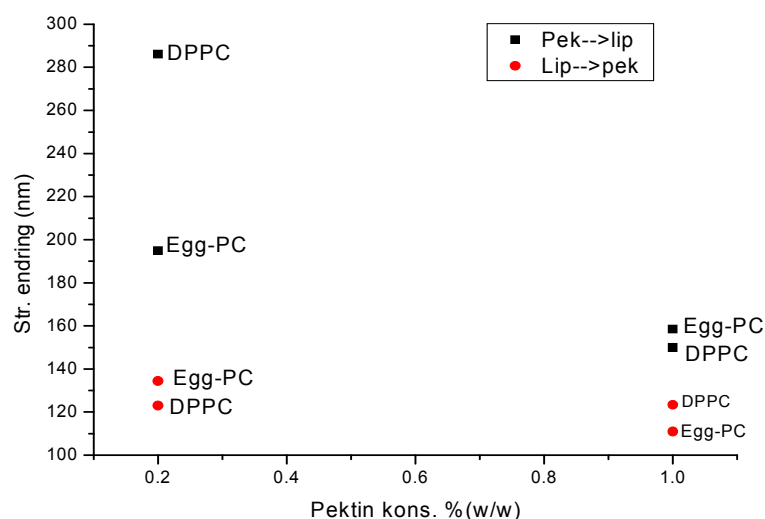
Tilsetningshastigheten hadde ikke signifikant effekt på zetapotensiale i screeningen og ble ikke undersøkt videre i optimaliseringsdesignet.

Faktorenes betydning for endring i partikkelstørrelse

Fasetilstanden til lipidene i liposomsuspensjonen framkom ikke som signifikant for endring i partikkelstørrelse ($p>0,05$, kap 6.3.1). Dette ble funnet i PLS-1 modelleringen av fullfaktorforsøket, 2^3 design. Modellen fra analysen hadde god forklaringsgrad og inneholdt bare signifikante faktorer eller faktorer med

usikkerhetsgrenser som viste at de sannsynligvis var av betydning (kap 6.3.1). Det ble dermed vurdert som riktig at fasetilstanden var uten betydning. For å forenkle den videre undersøkelsen av systemet ble det valgt å bare benytte gelfase liposomer (DPPC). Positive liposomer med DPPC er i studier funnet mindre toksiske for bukkale celler enn positive liposomer med egg-PC (Smistad, G. et al. 2007).

Tilsetningsrekkefølge (t-rekk), hadde signifikant påvirkning på størrelsesendringen ($p < 0,05$, kap 6.3.1). Figur 7-4 viser at partikkelstørrelsene økte mest når pektin ble dryppet til liposomene.



Figur 7-4: Effekten av tilsetningsrekkefølgen og pektinkonsentrasjonen på størrelsesendringen ved dekking av positive liposomer med LM-pektin.

Henriksen med flere (1994) har beskrevet at tilsetningsrekkefølgen påvirker kinetikken for dekkingen. Forsøkene deres viste at en initiell aggregering ble raskere restabilisert ved liposomtilsetning til kitosan enn ved motsatt rekkefølge. Forfatterne tilskriver dette at fullstendig adsorpsjon og dermed også stabilisering tok litt tid, og at tiden for adsorpsjon ble redusert dersom overskuddet av kitosan var umiddelbart tilgjengelig.

I følge McClements med flere (2005) forutsetter stabiliseringen at adsorpsjonen av polyelektrolytt til ladete kolloidale partikler er raskere enn partikkel-partikkel

kolloisjonen. I studier har dette blitt observert som økende flokkulatstørrelse ved økt omrørings tid, trolig på grunn av flere kollisjoner (Mabire, F. et al. 1983).

I fullfaktorforsøket for de pektindekkede liposomene skjedde det derimot ingen synlig aggregering eller restabilisering. De målte partikkelstørrelsene var heller ikke så høye at det kunne mistenkes multikompleks-aggregater, som diskutert under del 1 (kap 7.2). En mulig forklaring på effekten av tilsetningsrekkefølgen kan være, som Henriksen med flere (1994) forklarte det for kitosan, at pektinadsorpsjon var raskere ved liposomtilsetning til pektinløsningen. Denne kinetikkforskjellen kan ha påvirket konformasjonen til de adsorberte kjedene. Konformasjonen til de adsorberte kjedene påvirker som diskutert tidligere tykkelsen til det adsorberte laget (Claesson, P. M. og Ninham, B. W. 1992; Lauten, R. A. 2004; Guzey, D. og McClements, D. J. 2006). Hvis denne hypotesen stemmer, fører rask adsorpsjon til tett/flat konformasjon av kjedene på partikkeloverflaten.

En annen forklaring kan være at pektinløsningen som liposomene ble dryppet ned i stod på kraftig omrøring. Dette kan ha redusert kjedenes interaksjoner med hverandre, og kjedene kan ha strukket seg ut og lagt seg i flytning, slik pseudoplastiske polymerer gjør når løsningene påføres et skjærstress (Wang, Q. og Cui, S. W. 2005). Det er mulig at en slik polymerløsning adsorberer flatere til en partikkeloverflate. Uavhengig av mekanisme skyldes effekten av tilsetningsrekkefølgen sannsynligvis konformasjonen av adsorbent pektin og ikke mengden, siden faktoren ikke var av betydning for zetapotensiale. Da en flat adsorpsjon reduserer flokkuleringsrisikoen (Demaroger-Andre, S. og Domard, A. 1994), ble det valgt å fortsette med liposomtilsetning til pektinløsning i senere forsøk.

Økning av **pektinkonsentrasjonen** fra 0,2 til 1 %(w/w) reduserte antageligvis størrelsesendringen i det fullfaktorielle screeningforsøket (Figur 7-4 og kap 6.3.1). Effekten var ikke signifikant, men usikkerhetsgrensene viste en trend. Med så få forsøk i forhold til hvor komplekst systemet var, er det mulig at betydningsfulle faktorer kom ut som ikke-signifikante med trender. Et forstyrrende moment var muligheten for tilstedeværelse av aggregater i pektinløsningene ved så høye

konsentrasjoner som opp til 1 %(w/w). Ved 1,5 %(w/w) løsninger av LM-pektin i vann er det beskrevet at kjedene var assosiert med hydrogenbindinger (Kjønicksen, A.-L. et al. 2003). På grunn av assosiasjonsmuligheten og usikkerheten med henhold til signifikans, ble det valgt å undersøke faktoren videre, men på lavere konsentrasjonsnivåer.

Effekten av pektinkonsentrasjonen ned til 0,05 %(w/w) ble undersøkt ved screeningen i det reduserte faktorforsøket. PLS-1 analysen som ble utført ga ingen endelig modell: Ikke-signifikante faktorer, deriblant pektinkonsentrasjonen ble beholdt (Figur 6-11). Modellen måtte tolkes med forsiktighet, fordi den gode forklaringsgraden kunne skyldes overtilpasning. Forskjellen mellom RMSEC og RMSEP var også stor. Dette kan skyldes at det før modelleringen ble fjernet en prøve. Ved kryssvalideringen ble undermodellene da laget på grunnlag av bare 9 prøver, noe som gjorde at variasjonen mellom predikert og målt valideringsprøve, og dermed RMSEP, ble stor. Dette gjør også at det ble vanskelig å finne signifikante faktorer, fordi signifikansvurderingen baserer seg på om effektene av faktorene var stabile i de ulike undermodellene (Esbensen, K. H. 2006, s. 214, s. 327). Siden forklaringsgraden sank kraftig når pektinkonsentrasjonen ble fjernet, var det mulig at faktoren var av betydning på en eller annen måte. Dette var imidlertid usikkert, fordi det også kunne skyldes overtilpasning. Det ble derfor ikke gjort noen antagelser om pektinkonsentrasjonens effekt på bakgrunn av forsøket. Modellen ble stående slik den var, fordi et så komplekst system vanskelig kan beskrives fullstendig av bare 7 designprøver og 3 senterpunkt. Det var klart at flere forsøk måtte gjøres.

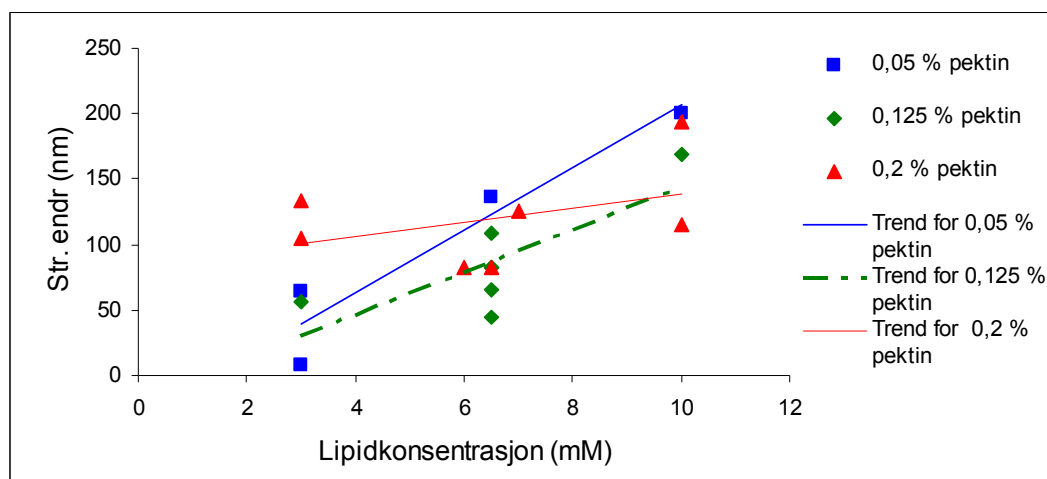
Pektinkonsentrasjonen ble funnet som en viktig faktor for zetapotensiale, og den ble derfor undersøkt videre i optimaliseringsdesignet. Her ble det funnet at ved pektinkonsentrasjoner i området 0,05-0,2 %(w/w) var **annengradsleddet (pek**2)** signifikant for størrelsesøkningen ($p < 0,05$, Figur 6-13). Effekten var positiv, slik at høyere pektinkonsentrasjon medførte økte partikkelstørrelser. Årsaken til at det ikke ble funnet signifikant effekt av pektinkonsentrasjonen i det reduserte faktorforsøket, kan da være en kombinasjon av at slike design ikke kan detektere annengradsledd og

at forsøket hadde for få prøver. Modellen fra optimaliseringsdesignet var bedre. Den inneholdt kun signifikante faktorer, eller faktorer med usikkerhetsgrenser som viste at de sannsynligvis var betydningsfulle (Figur 6-13). Modellen ga således en bedre beskrivelse av systemet. Da forskjellen mellom RMSEP og RMSEC var betraktelig lavere (12 nm, kap 6.3.3) enn i det reduserte faktorforsøket (24 nm, kap 6.3.2) er modellen også bedre egnet for prediksjon av framtidige prøver. Modellen ble beholdt som den endelige modellen for størrelsesendringen til de pektindekkede liposomene.

Effekten av pektinkonsentrasjonen må sees i sammenheng med effekten av **lipidkonsentrasjonen**. Lipidkonsentrasjonen var den eneste signifikante faktoren i det reduserte faktorforsøket (Figur 6-11) og ble derfor undersøkt videre i optimaliseringsdesignet. Også her var faktoren signifikant (Figur 6-13). I begge forsøkene var effekten at økende lipidkonsentrasjon økte partikkelstørrelsene.

Samspillet mellom pektinkonsentrasjonen og lipidkonsentrasjonen var ikke signifikant i optimaliseringsdesignet, men usikkerhetsgrensene viste at det antageligvis var betydningsfullt, med negativ effekt (Figur 6-13). Det kan derfor forsvares at samspillet ble beholdt i den endelige modellen. I det reduserte faktorforsøket hadde heller ikke samspillet signifikant effekt, men en usikker trend til negativ effekt. Samspillet var der sammenblandet med samspillet mellom de to siste faktorene, mengde ladet lipid og tilsetningshastighet. Ingen av disse faktorene hadde imidlertid signifikant effekt, og det er rimelig å anta at heller ikke samspillet hadde det (Guyot, D. 2006, s. 361-447). Det er derfor mest sannsynlig at det observerte samspillet var lip-k*pek-k. Samsvaret mellom effekten av lip-k*pek-k i begge forsøkene styrker antagelsen om at den faktisk hadde betydning på systemet.

Figur 7-5 kan gi forståelse for effektene av pektinkonsentrasjonen og lipidkonsentrasjonen. Figuren viser at den positive effekten av lipidkonsentrasjonen var tydelig ved lavt og middels nivå av pektinkonsentrasjonen, men nærmest ubetydelig ved høy pektinkonsentrasjon. Ut fra kryssplottet kan den negative effekten av lip-k*pek-k forstås som at økende pektinkonsentrasjon reduserte den positive effekten av lipidkonsentrasjonen.

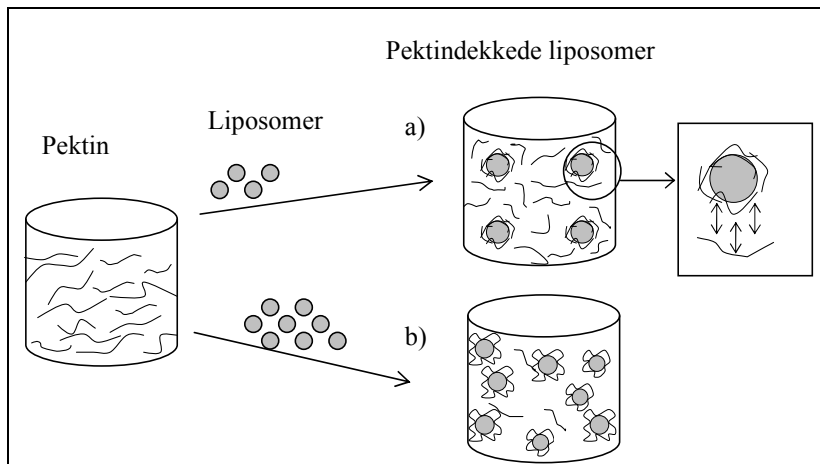


Figur 7-5: Effekten av lipidkonsentrasjonen (mM) på størrelsesendringen for prøvene i optimaliseringsdesignet, fordelt på pektinkonsentrasjonen (w/w%).

Henriksen med flere (1997) beskriver den irreversible dekkingsreaksjonen mellom liposomer og kitosan med likningen $C + L \rightarrow CL$, hvor C= kitosan, L=liposomer og CL= dekkede liposomer. Reaksjonen vil i følge forfatterne fortsette inntil overflatene av liposomene er dekket. Det er rimelig å anta at tilsvarende reaksjon gjelder for liposomer og pektin. Mens en slik reaksjon pågår er det sannsynlig at konsentrasjonen av fritt pektin i løsning synker.

I følge Guzey med flere (2006) er tykkelsen og strukturen til laget som dannes når polyelektrolytter adsorberes til overflater svært avhengig av miljøfaktorer som pH, ionestyrke og temperatur. På samme måte er det rimelig å anta at konformasjonen til adsorberte pektinkjeder var avhengig av fritt pektin i løsning. Ved lavere liposomkonsentrasjoner i prøvene var overflatearealet som skulle dekkes mindre, slik at konsentrasjonen av fritt pektin kan ha vært høyere. Den elektrostatiske frastøtning mellom frie og adsorberte pektinkjeder kan ha ført til at kjedene adsorberte tettere. Dersom fri pektinkonsentrasjon sank ved økende mengde liposomer, er det mulig at kjedene kunne adsorberes i større "looper" uten frastøtning fra pektin i løsning (Figur 7-6). Dette samstemmer med den signifikante størrelsesøkningen som ble observert når overskuddet av pektin ble vasket vekk ved ultrasentrifugering i del 1 av oppgaven ($p < 0,0005$, Tabell 6-9). Ved høye

pektinkonsentrasjoner er det mulig at forskjellen i fri pektinkonsentrasjon ved ulike lipidkonsentrasjoner ikke var stor nok til å affekttere kjedenes konformasjon.



Figur 7-6: Enkel skisse av mulig en mekanisme for effekten av lipidkonsentrasjonen. a) Lav lipidkonsentrasjon og høy fri pektinkonentrasjon, b) høy lipidkonsentrasjon og lav fri pektinkonsentrasjon

Det er funnet at forholdet mellom lipid og polymer var betydningsfullt for liposomer (Henriksen, I. et al. 1997) og lipiddispersjoner (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993) dekket med kitosan. Effekten som ble observert i disse studiene var også økende partikkelstørrelse ved økende lipid/polymer forhold. Den antatte forklaringen til mekanismen var økt flokkulering ved ladnings-mosaikk mekanismen (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993; Henriksen, I. et al. 1997). Det er imidlertid lite sannsynlig at effekten observert i dette arbeidet var en tilsvarende flokkulering, på grunn av kompleksenes lave partikkelstørrelser, som diskutert i kap 7.2.

Claesson med flere (1992) har vist at konformasjonen til kitosanlag adsorbert til negative overflater er pH avhengig. Ved lave pH-verdier, hvor polymeren var sterkt ladet, var tykkelsen på det adsorbte laget lav på grunn av flat adsorbsjon. Ved høyere pH verdier, hvor polymeren var mindre ladet, var laget tykkere fordi kjedene adsorbte som looper. På samme måte kan variasjonen i pH mellom designprøvene ha påvirket kjedenes konformasjon i optimaliseringsforsøket og være en underliggende variabel.

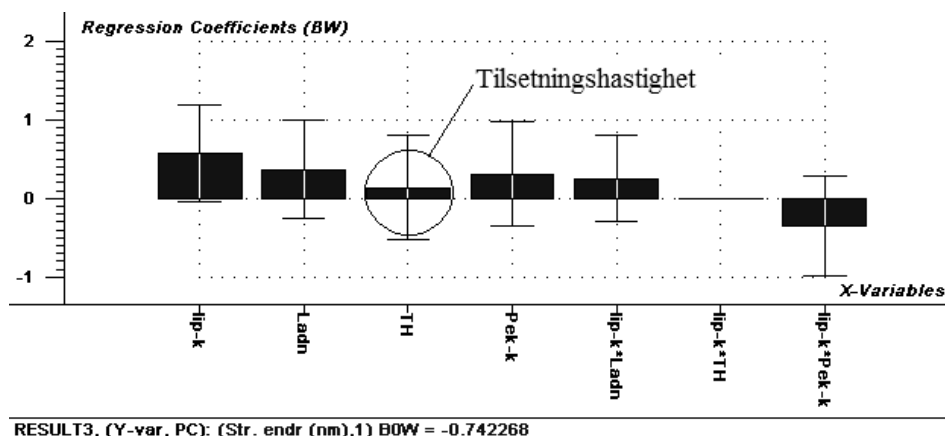
Figur 7-5 viser at alle prøvene med 0,2 %(w/w) pektin hadde relativt store størrelsesøkninger. Sett sammen med resultatene fra Claesson med flere (1992) kan dette skyldes at pektinet ved pH 4 var mindre ladet enn ved pH 6-7, slik at det selv ved lave liposomkonsentrasjoner var adsorbert i loop-konformasjoner. Dette kan i så tilfelle forklare det negative samspillet lip-k*pek*: Når pektinkonsentrasjonen økte forsvant effekten av å øke lipidkonsentrasjonen, fordi kjeden da adsorberte som loop uavhengig av fri pektinkonsentrasjon. Slik kan også positiv effekt av pek**2 forklares med at økende pektinkonsentrasjoner reduserte pH og dermed økte andelen adsorbert som loop. Hypotesen svekkes imidlertid av at økt pektinkonsentrasjon ga mer negativt zetapotensiale (Tabell 6-15), fordi det betyr at økende pektinkonsentrasjon heller gjorde partiklene mer negative enn mindre. Dette tatt i betraktning er det mer sannsynlig at den positive effekten av pek**2 på størrelsesendringen skyldtes at mer pektin ble adsorbert. Dette er, som beskrevet, også en sannsynlig forklaring for pektinets store effekt på zetapotensialet. Sett sammen kan resultatene tyde på at ved lav lipidkonsentrasjon økte partikkelstørrelsene når pektinkonsentrasjonen økte, fordi dekkingsgraden ble høyere. Ved høyere lipidkonsentrasjon ble derimot størrelsene store selv ved lav pektinkonsentrasjon, fordi kjedene ekspanderte til loop-konformasjoner.

Økte partikkelstørrelser ved økt pektinkonsentrasjon i området 0,05-0,2 %(w/w) kan virke motstridene med den sterke trenden til lavere partikkelstørrelser i området 0,2-1 %(w/w). Dette kan lettere forstås ved å se det i lys av at også for zetapotensiale var effekten avhengig av konsentrasjonsområdet: I det høye området ble det ikke funnet effekt på zetapotensiale, antageligvis fordi liposomene var fullstendig dekket av pektin (s. 124). Hvis effekten på partikkelstørrelsen i det lave konsentrasjonsområdet skyldtes at mer pektin ble adsorbert, kunne effekten på samme måte ikke vedvare i det høye området hvor liposomene sannsynligvis var fullstendig dekket. Trenden til pektinkonsentrasjonen i området 0,2-1 %(w/w) var, som Figur 6-9 og Figur 7-4 viser, tvert i lavere partikkelsørrelser. Dette kan skyldes at elektrostatisk repulsjon mellom adsorbert pektin og fritt pektin hadde stor betydning når pektinkonsentrasjonen ble så høy som 1 % (w/w). En annen mulig forklaring er at fritt pektin økte ionstyrken til

mediumet, slik at det elektriske dobbeltlaget rundt de dekkede liposomene ble komprimert og de målte størrelsene lavere (Morfesis, A. 2008). Figur 7-4 viser at effekten av å øke pektinkonsentrasjonen fra 0,2 til 1 %(w/w) hadde størst betydning når pektin ble dryppet til liposomene. Sannsynligvis skyldes dette at ved drypping av liposomer til pektin var kjedene relativt flatt adsorbert ved begge konsentrasjonene. Dette styrker hypotesen om at pektinets konformasjon var hovedforskjellen ved 0,2 og 1 %(w/w) pektin: Tilsetningsrekkefølgen kan som diskutert påvirke kjedenes konformasjon, men den kan ikke påvirke ionestyrken til mediumet. Hvis effekten av pektinkonsentrasjonen skyldtes påvirkning av ionestyrken, skulle den altså vært til stede ved begge tilsetningsrekkefølgene.

PCA av responsverdiene viste at zetapotensiale var negativt korrelert til størrelsesendringen (Figur 6-10). Dette innebærer at økt partikkelstørrelse fulgtes av et mer negativt zetapotensiale. I studier for dekking av liposomer med kitosan observerte Laye med flere (2008) at opp til liposomoverflaten var mettet økte partikkelstørrelsene parallellt med zetapotensiale. Dette ble forklart med at mer kitosan ble adsorbert slik at størrelsene økte samtidig som mer av liposomenes ladning ble nøytralisert. Den observerte korrelasjonen mellom zetapotensiale og størrelsesendring her kan ha samme forklaring. Dette samstemmer med at pektinkonsentrasjonen i det lave området (0,05-0,2 %(w/w)) både økte størrelsen og gjorde zetapotensiale mer negativt.

Tilsetningshastigheten hadde ikke signifikant effekt for endring av partikkelstørrelsen ($p > 0,05$). Faktoren hadde liten regresjonskoeffisient i det reduserte faktorforsøket (Figur 7-7).



Figur 7-7: Vektet regresjonskoeffisient for tilsetningshastighet (TH) var liten i det reduserte faktorforsøket, og faktoren ble derfor fjernet tidlig.

Den ble derfor fjernet tidlig i modelleringen og ikke undersøkt videre i optimaliseringsdesignet. I studier for dekking av liposomer med kitosan, ble det imidlertid funnet lavere størrelser ved høyere tilsetningshastighet (Henriksen, I. et al. 1997). Forfatterne forklarte funnet med at dekkingen skjedde saktere ved lav tilsetningshastighet, slik at liposomene ble ufullstendig dekket. Dette ga flokkulering ved ladnings-mosaikk mekanismen (mekanismen beskrives nedenfor). Effekten ble imidlertid kun observert ved høy ionestyrke (154 mM) og ikke ved lav ionestyrke (10 mM). Dette kan ha hatt sammenheng med at salter skjermet ladninger og på den måten både reduserte drivkraften for adsorpsjon og ga polyelektrolyttene en mer kompakt konformasjon (Guzey, D. og McClements, D. J. 2006). Samtidig ble de elektrostatiske repulsjonskreftene som stabiliserte systemet skjermet (Morfesis, A. 2008). Flokkulering ved økende ionestyrke er tilsvarende beskrevet av Demager-Andre med flere (1993).

Det at tilsetningshastigheten ikke var signifikant i dette arbeidet, kan således tyde på at adsorpsjonen av pektin til liposomer ikke var hastighetsbegrensende, kanskje på grunn av at ionestyrken, 5 mM, var lav. Den lave ionestyrken kan også ha gjort at pektinkjedene var utstrakte og dermed lett dekket hele overflaten, selv ved lav tilsetningshastighet. Forsøk i etterkant av oppgaven hvor dekking av 10 mM liposomer (DPPC + 10 mol% DPTAP) med 0,2 %(w/w) LM-pektin ble utført i 20

mM fosfatbuffer medførte tydelig aggregering. Dette viser at økning i ionestyrke også fremmer flokkulering av pektindekkede liposomer.

Den faktorielle undersøkelsen viste at størrelsesendringen sannsynligvis var avhengig av om pektinkjedene adsorbte i loop eller flatt til liposomene, og eventuelt mengde pektin adsorbte. PCA av responsvariablene viste at **partikkelstørrelsen** var positivt korrelert til polydispersitetsindeksen (**PI**) (Figur 6-10). Det betyr at ved høye partikkelstørrelser, hadde prøvene også høy PI. Dette kan ha sammenheng med nettopp det at tykkelsen til det adsorbte laget er avhengig av konformasjonen til de adsorbte kjedene: Et tett adsorbte lag av pektin har sannsynligvis mindre variasjon i mulige konformasjoner enn kjeder adsorbte i loop. Dette kan gi smalere størrelsesfordeling og således lavere PI. Når de pektindekkede liposomene ble vasket i del 1 av oppgaven, ble en tilsvarende observasjon gjort: Både partikkelstørrelse og polydispersitetsindeks økte signifikant ($p < 0,05$, Tabell 6-9).

Vurdering av avvikende designprøver

Det var to prøver som skilte seg ut fra de øvrige i det reduserte faktorforsøket (2^{4-1} -design). Dette var prøve 1a, som hadde svært lav størrelsesendring (7,6 nm) og lav PI (0,175), og prøve 6a, som hadde svært høy størrelsesendring (508 nm) og PI (0,529). Begge prøvene hadde relativt lite negativt zetapotensiale, henholdsvis -34,5 og -29,6.

Prøve 1a var kombinasjonen med lavt nivå av alle de undersøkte faktorene. Endringen i partikkelstørrelse var så lav at det var usikkert om liposomene ble dekket.

Usikkerheten var spesielt knyttet til at endringen var av samme størrelsesorden som endringen ved dekking av negative liposomer med LM-pektin (2 nm, Tabell 6-4).

Zetapotensiale skiftet imidlertid fra positivt til negativt. Dette kan skyldes at pektinets zetapotensiale overskygget zetapotensiale til liposomene. Denne forklaringen er imidlertid lite sannsynlig. Undersøkelsene av zetapotensiale til pektin i del 1 av oppgaven indikerte at ved så lav konsentrasjon samt fortynning før måling, ville LM-pektin hatt et lite negativt zetapotensiale med bred toppfordeling (vedlegg 1). En rimligere forklaring er at den lave mengden ladet lipid kombinert med lav

pektinkonsentrasjon gav lav drivkraft for adsorpsjon, slik at kun små mengder pektin ble adsorbert. Dette kan i så tilfelle forklare at zetapotensiale var noe mindre negativt enn for flertallet av prøvene. Uten mikroskopibilder er det likevel ikke mulig å si dette sikkert. Prøve 1a ble ikke fjernet før modellering, da det ble vurdert som mest sannsynlig at liposomene var dekket.

Prøve 6a var kombinasjonen med lav pektinkonsentrasjon, lav mengde ladet lipid, høy lipidkonsentrasjon og høy tilsetningshastighet. Partikkelstørrelsen til kompleksene var 632 nm. Sammenliknet med de andre prøvene er dette en så stor størrelse at det er lite sannsynlig at de målte partiklene var enkeltliposomer dekket med et lag pektin. En mulighet er da at suspensjonen var flokkulert.

”Ladnings-mosaikk” modellen og brodanning er to omtalte mekanismer for flokkulering av kolloide partikler med polymerer (Gregory, J. 1973; Mabire, F. et al. 1983; Henriksen, I. et al. 1997).

Brodanningsmekanismen går ut på at individuelle partikler holdes sammen i flokkulater av polymerbroer og gjelder spesielt når polymerene er nøytrale (Mabire, F. et al. 1983). Mekanismen er også blitt beskrevet for ladete kolloide partikler og polyelektrolytter av motsatt ladning, dersom polyelektrolyttkonsentrasjonen er lavere enn nødvendig konsentrasjon for metning av partikkeloverflaten, C_{sat} (McClements, D. J. 2005; Guzey, D. og McClements, D. J. 2006).

Ladnings-mosaikk modellen beskriver også polyelektrolyttadsorpsjon til en motsatt ladet kolloid partikkel, der polyelektrolyttkonsentrasjonene er for lav til å dekke partikkeloverflaten fullstendig. Denne modellen går imidlertid ut på at kollisjon mellom flere slike partikler kan gi elektrostatisk tiltrekking mellom udekket område på den ene partiklen og dekket på den andre, slik at flokkulering finner sted (Gregory, J. 1973; Mabire, F. et al. 1983). En slik flokkulering er observert blant annet for negative silikapartikler flokkulert med kationiske polymerer (Gregory, J. 1973; Mabire, F. et al. 1983), negative lipiddispersjoner med kitosan (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993) og negative liposomer flokkulert med kitosan (Henriksen, I. et

al. 1994). I alle de nevnte artiklene ble dispersjonen restabilisert ved å øke mengde polyelektrolytt.

Laye med flere (2008) har foreslått at mekanismen for flokkulering ved dekking av negative liposomer med lave mengder kitosan verken er brodanning eller ladnings-mosaikk. I stedet foreslåes en koacervatdannelse, der liposomene disintergrerer og fosfolipidmolekyler bindes til kitosankjedene (Laye, C. et al. 2008).

De refererte mekanismene har til felles at flokkulering skjedde dersom polymerkonsentrasjonen var for lav. Prøve 6a hadde også lav pektinkonsentrasjon og høy lipidkonsentrasjon, noe som kan tyde på at prøven flokkulerte på grunn av for lav dekkingsgrad.

Uavhengig av mekanismen, er det vist at ladnings-mosaikk flokkulater (Mabire, F. et al. 1983), brodannede flokkulater (Guzey, D. og McClements, D. J. 2006) og koacervater (Laye, C. et al. 2008) hadde lavere absoluttverdi av zetapotensiale enn stabiliserte partikler. Dette forklares med den ufullstendige dekkingen, som også er årsaken til flokkuleringen og koacervatdannelsen (Mabire, F. et al. 1983; Guzey, D. og McClements, D. J. 2006; Laye, C. et al. 2008). Prøve 6a hadde mindre negativt zetapotensiale enn de resterende prøvene. Dette samstemmer med forklaringene overfor og kan tyde på en ufullstendig dekking. Årsaken til at nettopp denne prøven flokkulerte, kan være at mengde ladet lipid var lav, samtidig som pektinkonsentrasjonen også var lav og lipidkonsentrasjonen var høy. Denne faktorkombinasjonen kan ha gitt lav drivkraft for dekking, siden mengde ladet lipid og pektinkonsentrasjon i følge effektene på zetapotensiale sannsynligvis var viktig for drivkraften. Sedimenteringen i hetteglasset i løpet av 14 dager kan også tyde på at prøve 6a ikke bestod av stabiliserte pektindekkede liposomer, da økende flokkulatstørrelse kan korreleres til sedimenteringshastighet (Mabire, F. et al. 1983).

Det andre forforsøket for optimaliseringsdesignet indikerte også betydningen av forholdet mellom verdiene av de ulike faktorene. Forsøket viste at å justere alle faktorene til $\frac{1}{2}$ eller $-\frac{1}{2}$ gjorde det mulig å fremstille stabiliserte pektindekkede

liposomer, i motsetning til å justere én til sin middelsverdi og beholde ytterpunktverdiene av de to andre. Det kan tyde på at det er viktig å ha et tilstrekkelig stort overskudd av pektin i forhold til liposomer for å unngå flokkulering, men at mengde ladet lipid påvirker behovet for overskudd av pektin.

Da prøve 6a sannsynligvis hadde en annen struktur og således beskrev et annet fenomen enn de stabiliserte pektindekkede liposomene, ble denne prøven fjernet før modelleringen av det reduserte faktorforsøket. Prøven ble også foreslått som en innflytelsesrik uteligger av programvaren og skilte seg ut i influenceplottet og scoreplottet. Det er imidlertid et viktig resultat at denne faktorkombinasjonen flokkulerte, fordi det viste en yttergrense for mulige kombinasjoner av faktorene.

Under verifiseringen i del 1 av oppgaven, ble flokkulering med tilsvarende høye partikkelstørrelser observert for 3 mM positive liposomer med 10 mol% ladet lipid dekket av 0,005 % (w/w) HM-pektin (Tabell 6-6). Den lave pektinkonsentrasjonen tilsier at flokkuleringen var forårsaket av en av de omtalte mekanismene.

Flokkuleringen ble kun sett for HM-pektin og ikke amidert pektin. En forklaring kan være at HM-pektin hadde høyest molekylvekt. Høyere molekylvekt har i tidligere studier gitt økt flokkulering av negative liposomer (Henriksen, I. et al. 1997) og lipidmiceller (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1994) med kitosan. Dette skyldtes antageligvis at adsorpsjonen i større grad skjedde som loop, slik at sannsynligheten for interaksjoner med andre partikler økte. Liposomer dekket med HM-pektin hadde høyest partikkelstørrelse i de innledende studiene (Tabell 6-3), noe som kan tyde på nettopp større andel loopadsorpsjon. Det er også tidligere foreslått at lavere molekylvekt gir jevnere adsorpsjon av positive polymerer til negative silikapartikler, og dermed mindre flokkulering ved ladnings-mosaikkmekanismen (Gregory, J. 1973). Samtidig har studier vist at det antageligvis finnes en minimums grense for molekylvekt, hvor polymerer med molekylvekt under grensen ikke kan reversere ladningen fullstendig, noe som gir flokkulering (Henriksen, I. et al. 1994).

En annen mulig forklaring på flokkuleringen av positive liposomer med 0,005% (w/w) HM-pektin, er at HM-pektin har minst negativ ladning av pektintypene. Dette

kan ha gitt mindre drivkraft for adsorpsjon, slik at den nødvendige reverseringen av zetapotensiale uteble. Eventuelt kan HM-pektinets lave ladning ha medført en mer sammenkveilet konformasjon som var mindre egnet til å dekke liposomoverflaten fullstendig og samtidig økte sannsynligheten for brodanningsflokkulering. En slik effekt er sett for negative liposomer og kitosan ved pH verdier over kitosanets pKa (Henriksen, I. et al. 1997). Sistnevnte forklaring er imidlertid mindre sannsynlig her, fordi hugginskonstantene til HM- og amidert pektin i fosfatbufferen (Tabell 6-2) var svært like.

7.3.3 Faktorforsøkernes relevans for liposomer dekket med HM-pektin og amidert pektin

I det reduerte faktorforsøket (2^{4-1} -design) kom det fram at kombinasjon av høy lipidkonsentrasjon, høy tilsetningshastighet, lav pektinkonsentrasjon og lav mengde ladet lipid ga flokkulerte pektindekkede liposomer. Produksjon av stabiliserte pektindekkede liposomer krevde en endring i faktorene, til punktet 8,25 mM lipidkonsentrasjon, 4 mol% ladet lipid og 0,0875 %(w/w) pektin.

Faktorforsøkene ble kun utført for dekking av liposomer med LM-pektin. For å vurdere om de samme flokkuleringsproblemene var tilstede ved dekking med HM- og amidert pektin, ble begge behandlingskombinasjonene produsert. I tillegg ble senterpunktet produsert, som en kontroll på stabiliserte pektindekkede liposomer.

Prøvene med samme faktorkombinasjonen som den flokkulerte prøven i det reduserte faktorforsøket hadde høyere partikkelstørrelse og PI enn senterprøvene både for amidert og HM-pektin (Tabell 6-16). Forskjellene ble vurdert til å være så store at disse prøvene (HM-aggr og Am-aggr) sannsynligvis var flokkulerte. Denne mistanken ble ytterligere styrket av at zetapotensialene var mindre negative enn zetapotensialene til senterprøvene (Tabell 6-16), samt at begge prøvene sedimenterte etter ca en uke. Dette var også tilfellet for den flokkulerte prøven i 2^{4-1} -designet.

De flyttede punktene (Am-flyttet og HM-flyttet) hadde partikkelstørrelser og zetapotensiale nærmere senterprøvene (Tabell 6-16). Dette kan tyde på at disse prøvene ikke var flokkulerte. Altså kan det se ut som den samme begrensningen mellom faktorer var gjeldene ved alle tre pektintypene.

Forsøket viser også at begge de flyttede prøvene hadde høyere endring i partikkelstørrelse enn senterprøvene (Tabell 6-16). Effekten var tydeligst for dekking med amidert pektin, men også av betydelig størrelse for HM-pektin. Faktorforsøkene i del 2 fant at lipidkonsentrasjonen hadde en positiv effekt på endring i partikkelstørrelse ved dekking (Figur 6-13). Det kan se ut til at HM- og amidert pektin følger samme trend, siden lipidkonsentrasjonen økte fra senterprøvene til de flyttede prøvene.

7.3.4 Oppsummering del 2

I del 2 ble effekten av prosess- og formuleringsfaktorer for dekking av liposomer med pektin evaluert i tre faktorforsøk. Prosessfaktorer som ble undersøkt var tilsetningsrekkefølge og hastighet. Formuleringsfaktorer som ble undersøkt var fasetilstanden av lipidene i liposomene, pektinkonsentrasjonen, mengde ladet lipid i liposomsuspensjonen og lipidkonsentrasjonen i liposomsuspensjonen. Faktorenes effekter på størrelsesendringen og zetapotensiale kunne forklares med påvirkning på konformasjonen til de adsorberte pektinkjedene og/eller mengde adsorbert pektin.

Tilsetningsrekkefølgen hadde signifikant effekt på endring i partikkelstørrelse ($p < 0,05$). Tilsetning av liposomer til pektin medførte minst økning i partikkelstørrelsene, og kan således benyttes om flat adsorpsjon av pektin ønskes. Tilsetningshastigheten av liposomer til pektin ble ikke funnet signifikant for størrelsesendring eller zetapotensiale og kan således velges etter hva som er praktisk innen det undersøkte området 1,2-5,5 ml/min.

Lipidkonsentrasjonen ble funnet av signifikant betydning for størrelsesendringen og zetapotensialet ($p < 0,05$). Økt lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonen økte

partikkelstørrelsene, men effekten var mindre uttalt ved høye pektinkonsentrasjoner. Økende lipidkonsentrasjon ga mindre negativt zetapotensiale, men effekten vurderes til å ha liten praktisk betydning.

Effekten av pektinkonsentrasjonen var avhengig av konsentrasjonsområdet. I det lave området (0,05-0,2 % (w/w)) ble det funnet signifikant effekt på zetapotensiale og størrelsesendringen ($p < 0,05$). Ved økning av pektinkonsentrasjonen ble zetapotensiale mer negativt og partikkelstørrelsene økte. I det høye konsentrasjonsområdet (0,2-1 % (w/w)) var det en trend til mindre partikkelstørrelser ved økende pektinkonsentrasjon og ingen effekt på zetapotensiale.

Økende mengde ladet lipid gjorde zetapotensiale mer negativt ($p < 0,05$), men ved høye pektinkonsentrasjoner ble effekten av mindre betydning.

Fasetilstanden av liposomsuspensjonen ble ikke funnet signifikant for hverken størrelsesendring eller zetapotensiale ($p > 0,05$). Valget mellom DMPC og DPPC kan derfor gjøres på andre grunnlag, som for eksempel toksisitet. Dette utelukker ikke at andre hovedlipider vil gi andre effekter.

Oppsummerende viste de tre faktorforsøkene at mest negativt zetapotensiale oppnås ved å øke pektinkonsentrasjonen og mengde ladet lipid. Dersom det er ønskelig med relativ høy konsentrasjon av liposomer, for eksempel 10 mM, og moderat høye partikkelstørrelser, bør konsentrasjonen til pektinløsningene være 0,125 % (w/w) eller høyere.

Kombinasjon av høy lipidkonsentrasjon, lav pektinkonsentrasjon og lav mengde ladet lipid ga flokkulerte prøver, trolig på grunn av for lav dekkingsgrad av liposomene. Innen det undersøkte forsøksrommet var kombinasjonen 8,25 mM lipid, 4 mol% ladet lipid og 0,0875 % (w/w) pektin det ytterste undersøkte punktet som sannsynligvis ikke flokkulerte. De samme begrensningene for faktorkombinasjoner synes å gjelde for dekking med HM- og amidert pektin.

7.4 Del 3: Stabilitetsstudie av pektindekkede liposomer

Hensikten med del 3 var å undersøke de pektindekkede liposomenes stabilitet, og å sammenlikne denne med stabiliteten til positive liposomer. Hypotesen var at pektinet ville gi liposomsuspensjonene sterisk og elektrostatisk stabilisering. I tillegg var det ønskelig å undersøke om de pektindekkede liposomenes egenskaper, herunder tykkelse på adsorberte laget og pektintype, hadde påvirkning på produktets stabilitet. Del 3 var også viktig for å bekrefte antagelsen om at det i del 1 og 2 var blitt fremstilt stabiliserte pektindekkede liposomer.

Partikkelstørrelsen ble valgt som respons fordi endringer i denne kunne vise endringer i strukturen til liposomene og de pektindekkede liposomene. Partikkelstørrelsen har tidligere blitt brukt som respons for stabilitetsstudie av kitosandekkkede liposomer (Henriksen, I. et al. 1997). Zetapotensiale og pH ble målt fordi det var antatt at disse responsene kanskje kunne påvirkes dersom pektinet ble brutt ned over tid. For sammenlikning ble pH og zetapotensiale til pektinløsningene målt intermitterende under stabilitetsstudien.

Det var rimelig å anta at det ville skje sedimentering i hetteglassene dersom de pektindekkede liposomene flokkulerte eller pektinet desorberte fra liposomene og disse fusjonerte. De pektindekkede liposomene ble derfor observert for eventuell sedimentering i hetteglassene over tid.

Del 1 og 2 av oppgaven viste at liposomer dekket med LM-, HM-, og amidert pektin hadde ulike zetapotensiale og partikkelstørrelser. Produktenes stabilitet kunne derfor være ulike. Pektintypene kan i følge studier ha ulik evne til mukoadhesjon (Schmidgall, J. og Hensel, A. 2002; Liu, L. S. et al. 2005; Hagesaether, E. og Sande, S. A. 2007; Takeada, C. et al. 2007; Thirawong, N. et al. 2007; Hagesaether, E. og Sande, S. A. 2008). Evne til beskytte liposomene mot lekkasje kan også være ulik, uten at dette er studert tidligere for pektindekkede liposomer. Da det enda ikke er avklart om en av pektintypene er overlegen de andre med hensyn på mukoadhesjon og

beskyttelse mot lekkasje, var det av interesse å ha stabilitetsdata for pektindekkede liposomer med alle pektintype.

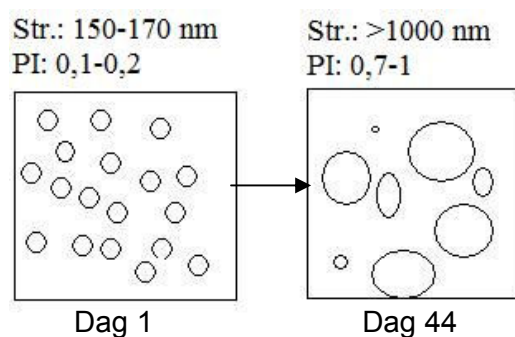
Videre var det ønskelig å teste stabilitet for pektindekkede liposomer med høy lipidkonsentrasjon, da høy lipidkonsentrasjon kan være ønskelig ved anvendelse som legemiddelformulering (Boulmedarat, L. et al. 2005; Erjavec, V. et al. 2006). Det ble derfor besluttet at 10 mM liposomsuspensjoner skulle dekkes med hver pektintype. I del 2 av oppgaven kom det fram at økt lipidkonsentrasjonen økte tykkelsen til det adsorberte laget, trolig ved å øke andelen adsorbert som loop (kap 6.3.3 og 7.3.2). Dette kan teoretisk sett redusere stabiliteten til formuleringen, ved å fremme brodanningsflokkulering (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1994). Pektinkonsentrasjonen ble satt til en middelsverdi, 0,125 %(w/w). Dette ble valgt fordi for lav konsentrasjon kunne gitt ufullstendig dekking og flokkulering av prøvene eller økt andelen adsorbert som loop. I følge DVLO-teorien er det sannsynlig at høyest mulig absoluttverdi av zetapotensiale stabiliserer systemet. Da mengde ladet lipid økte zetapotensiale i del 2, ble det valgt å benytte 10 mol% ladet lipid i liposomene.

På grunn av mulig flokkuleringsrisiko for den første formuleringen (formulering 1), ble det valgt å produsere en formulering (formulering 2) som på bakgrunn av funnene i del 2 av oppgaven hadde større sannsynlighet for flat pektinadsorsjon. I denne kombinasjonen ble pektinkonsentrasjonene redusert til 0,05 %(w/w) og lipidkonsetrasjonen redusert til 3 mM. 10 mol% ladet lipid ble beholdt for å fremdeles fremme høy absoluttverdi av zetapotensiale.

7.4.1 Sammenlikning av stabiliteten til positive liposomer, pektindekkede liposomer og pektinløsningene

Liposomer dannes fra lipid dobbeltlag som krummes til vesikler. Vesiklene har en høyere krummingsenergi enn dobbeltlagene, og dannelsen av vesikler krever derfor tilført energi. Dette medfører at liposomene befinner seg i en metastabil tilstand som molekylene er midlertidig fanget i (Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. 1994).

De positive liposomene i del 3 viste store økninger i partikkelstørrelse og polydispersitetsindeks etter lagring i 44 dager (Figur 6-19). Størrelsesøkningen kan tyde på at liposomene fusjonerte eller aggregerte. En slik økning i størrelse som følge av fusjonering eller aggregering relakserer krummingsenergien, fordi denne er proporsjonal med antallet liposomer (Lasic, D. D. 1993, s. 144). Den høye polydispersitetsindeksen kan skyldes at det ble stor spredning i partikkelstørrelsene ved fusjonering/aggregering, avhengig av hvor mange liposomer som ble sammenslått (Figur 7-8). Det er sannsynlig at størrelsesøkningen skyldtes fusjonering, da den ikke var reversibel ved omrystning.



Figur 7-8: Fusjonering av liposomer er en mulig mekanisme for størrelsesøkningen ved lagring av positive liposomer.

Zetapotensialene til de positive liposomene ble svakt redusert over den observerte perioden (Figur 6-19). Dette kan ha skyldtes nedbrytning av DPTAP, som er et positivt lipid av estertype. Liposomer med kvartære ammoniumlipider vil ha basisk overflate. I basisk miljø øker hydrolysehastigheten av esterbindinger, slik at det dannes ikke-esterifiserte fettsyrer med negativ ladning. Samtidig kan lyso positive lipider frigjøres fra liposomene (Simberg, D. et al. 2000). Dette kan forklarer reduksjonen i zetapotensialene. Studier har vist at 5-26 % av diacyl-TAP-er i positive liposomer ble brutt ned etter 2 måneders lagring i kjøleskap (Simberg, D. et al. 2000).

De pektindekkede positive liposomene viste ingen tilsvarende økning i partikkelstørrelse og PI i forsøksperioden (Figur 6-15). Dette tyder på at det adsorberte pektinet beskyttet liposomene mot eventuell aggregering og fusjonering. Resultatet samstemmer med andre studier av polymerdekkede liposomer. Økt stabilitet for negative unilamellære liposomer dekket med kitosan ved lagring i 45

dager ved romtemperatur, er beskrevet av Laye med flere (2008). Kitosandekkkede liposomer har tidligere blitt funnet stabile ved lagring 30 uker, 4°C (Henriksen, I. et al. 1997). Eksempler på andre anvendte metoder for å evaluere stabilisering av liposomer med polymerer, er måling av turbiditet og lekkasje av innkapslet substans ved tilsats av gallsalter. Gallsalter solubiliserer liposomene slik at de disintergrerer og reduserer på den måten turbiditeten (Dong, C. og Rogers, J. A. 1993). Svakere reduksjon i turbiditet og redusert mengde frisatt bærersubstans har blant annet blitt vist ved dekking av multilamellære liposomer med polysakkaridderivatet O-palmioylpullulan (Sehgal, S. og Rogers, J. A. 1995) og karboksymetylkitin (Dong, C. og Rogers, J. A. 1991). Stabilisering av liposomer ovenfor frysetørking har blitt beskrevet for unilamellære liposomer dekket med hydrofob modifisert polyvinyl alkohol (PVA) (Takeuchi, H. et al. 1998).

PCS som målemetode for tykkelsen på det adsorberte polymerlaget er sensitiv for ender av polymeren som protruderer ut i løsningen (tails/haler). Dette kan medføre at tykkelsen overestimeres (Lauten, R. A. 2004). Stabilisering forutsetter imidlertid at liposomene dekkes fullstendig av en polymer (McClements, D. J. 2005). Systemer med "haler" er imidlertid sannsynligvis ikke stabile, fordi de frie endene kan fremme brodannelsesflokkulering (Florence, A. T. og Attwood, D. 1998, s. 291). Det at de pektindekkede liposomene var stabile i 12 uker, kan slik tyde på at liposomoverflatene i stor grad var dekket av pektin og at sannsynligvis ikke andelen haler var av vesentlig betydning. Stabilitetsstudien styrker dermed hypotesen fra del 1 om strukturen til de pektindekkede liposomene, og det er rimelig å anta at produktene fremstilt i del 1 og 2 også var stabile.

Formulering 1 hadde høyest lipidkonsentrasjon, og for alle pektintypene var partikkelstørrelsene større enn partikkelstørrelsene til formulering 2 (Figur 6-15). Dette samstemmer med funnene i del 2 av oppgaven, hvor økt lipidkonsentrasjon økte tykkelsen på det adsorberte laget av pektin. Forskjellene i størrelser mellom liposomer dekket av de forskjellige pektintypene var de samme som del 1 av oppgaven også viste (Tabell 6-3 og Tabell 6-6). Det er verdt å bemerke at for batchene av

formulering 1 med HM-pektin var både partikkelstørrelse og polydispersitetsindeks spesielt høye (Figur 6-15). Størrelsene var så høye sammenliknet med prøvene fra del 1 (Tabell 6-3 og Tabell 6-6), at batchene mest sannsynlig bestod av flokkulater. Det var overraskende at flokkulatene hadde stabile partikkelstørrelser gjennom studien og ikke sedimenterte i hetteglassene. Funnet kan støttes av tidligere studier der kitosan av høy molekylvekt stabiliserte flokkulerte lipiddispersjoner ved å omslutte flokkulatene (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1994).

Zetapotensialene til de pektindekkede liposomene ble svakt mindre negative etter ca 5 uker og ut studieperioden (Figur 6-17). Endringen var mest uttalt for liposomer dekket med amidert pektin. Pektinløsningene viste den samme trenden til mindre negative zetapotensiale, men mye mer drastisk: For disse gikk zetapotensiale mot null og fordelingene var bredere (Tabell 6-17). Nylagede løsninger av alle pektintypene hadde i del 1 et definert zetapotensiale med smal toppbredde målt ufortynnet eller ved svak fortynning (Tabell 6-5). En mulig forklaring på det er, som diskutert, at pektinet var assosiert i løse aggregater som ble brutt opp ved fortynning. Under stabilitetsstudien ble pektinløsningene målt ved samme fortynning som de pektindekkede liposomene, for å avklare om eventuelle endringer i zetapotensialene skyldtes pektinløsningenes zetapotensiale. På grunn av denne fortynningen før måling kunne man ikke forvente smale topper for pektinløsningenes zetapotensiale, men det er likevel påtagelig at zetapoensialene gikk mot null. I del 1 av oppgaven var zetapotensialene negative selv ved mye fortynning (Tabell 6-5). Observasjonene i stabilitetsstudien kan forklares med at de opprinnelige pektinaggregatene ble borte over tid. Dette er sannsynlig, da det er kjent at pektin i løsning depolymeriserer ved hydrolyse og β -eleminering (Rolin, C. 1993; Voragen, A. G. J. et al. 1995; Thakur, B. R. et al. 1997).

Sett sammen, gir zetapotensialene for pektinløsningene og de pektindekkede liposomene to interessante observasjoner:

1. Del 1 og del 2 av oppgaven viste at pektinet hadde stor betydning for zetapotensiale til de pektindekkede liposomene. Del 3 viste at pektindekkede

liposomer beholdt negative zetapotensiale ved lagring, til tross for at pektinløsningenes zetapotensiale gikk mot null. Dette kan indikere at det adsorberte pektinet var beskyttet mot depolymerisering.

2. Mindre negativt zetapotensiale for de pektindekkede liposomene fra ca 5 uker og ut studien kan tolkes som at pektin etterhvert ble brutt ned sakte på liposomeoverflaten. Nedbrytningen gikk i så tilfelle raskest for liposomer dekket med amidert pektin.

En mulig forklaring på at zetapotensiale til liposomer dekket med amidert pektin endret seg mest, kan være at amidert pektin ikke var bundet like sterkt til liposomene som LM- og HM-pektin. Det finnes enda ingen fullstendig forståelse for polymerers interaksjoner med lipidmembraner (Liu, G. M. et al. 2009). Som nevnt tidligere er elektrostatiske interaksjoner trolig viktige (Demarger-Andre, S. og Domard, A. 1993; Mobed, M. og Chang, T. M. 1998; Takeuchi, H. et al. 2003; Sriamornsak, P. et al. 2007). Det har blitt vist at karboksylgrupper i LM-pektin interagerer elektrostatisk med positive liposomer (Sriamornsak, P. et al. 2007). Det er også vist at hydrofobe grupper som kan feste seg i lipidmembranene øker adsorpsjonen av polyetylglykol (PEG) (Liu, G. M. et al. 2009) og PVA (Takeuchi, H. et al. 1998) til liposomer. Det er mulig at slike hydrofobe interaksjoner ga sterkere adsorpsjon av HM-pektin til positive liposomer enn den lave prosenten karboksylsyregrupper skulle tilsi. Amidert pektin, derimot, har færre karboksylgrupper enn LM-pektin og er mindre hydrofob enn HM-pektin. Dette kan ha redusert adsorpsjonsstyrken av amidert pektin til positive liposomer, slik at desorpsjonen over tid var større. En alternativ forklaring kunne vært at amidgruppene i amidert pektin var delvis protonert og derfor ble frasøtet fra de positive liposomene slik at den totale adsorpsjonen ble svakere. Men fordi zetapotensialene viste at ladningen til amidert pektin var mer negativ enn HM-pektin (Tabell 6-5), er dette en lite sannsynlig forklaring.

pH-verdiene til de pektindekkede liposomene ble svakt surere gjennom studieperioden (Figur 6-18). pH-endringen tilsvarte pH-endringen i pektinløsningene (Figur 6-21). Det er derfor sannsynlig at endringene skyldtes et felles fenomen, som

for eksempel hydrolyse av metylestere i pektinet. Hydrolyse resulterer i frie karboksylsyregrupper og kan derfor potensielt redusere pH i løsningene (Voragen, A. G. J. et al. 1995). En annen mulig forklaring er begynnende mikrobiell vekst. Både bakterier og sopp har enzymer som kan bryte ned D-galakturonsyre (Richard, P. og Hilditch, S. 2009). Dette kan redusere pH i løsningen, for eksempel ved dannelse av CO₂ som er et biprodukt av mikroorganismenes katabolisme.

7.4.2 Oppsummering del 3

Sammenlikning av partikkelstørrelser og polydispersitetsindeks for liposomer og pektindekkede liposomer over en 12 ukers periode viste at dekking av liposomer med pektin økte den fysiske stabiliteten til de positive liposomene. Den gode lagringsstabiliteten forsterket også hypotesen om at overflaten til liposomene hadde en høy dekkingsgrad.

Zetapotensiale til de pektindekkede liposomene var stabile i ca 5 uker. Deretter ble zetapotensialene sakte mindre negative, noe som kunne tyde på at pektinet var i ferd med å brytes ned fra liposomoverflatene. Til tross for dette endret ikke partikkelstørrelsene seg. Dette betyr at det sannsynligvis fremdeles var bundet store mengder pektin til de positive liposomene etter 12 uker.

Det er mulig at amidert pektin var svakere bundet til de positive liposomene enn HM- og LM-pektin, fordi zetapotensiale til liposomer dekket med amidert pektin endret seg mest under lagringen.

Partikkelstørrelse, polydispersitetsindeks og zetapotensiale for de pektindekkede liposomene var avhengig av formuleringens sammensetning. Dette var i samsvar med resultatene i del 1 og 2 av oppgaven.

8. Konklusjon

Denne studien har vist at det er mulig å dekke positive liposomer enkeltvis med pektin ved å dryppe liposomene sakte til pektinløsninger under omrøring. Adsorpsjonen ble bekreftet ved endring i zetapotensialene fra positivt til negativt og moderat økning i partikkelstørrelsene. Disse resultatene skyldtes ikke pektinløsningenes egenskaper alene og vedvarte når overskuddet av pektin ble vasket vekk. Produksjonsmetoden hadde god reproducerbarhet. De pektindekkede liposomene var stabile ved 12 ukers lagring i kjøleskap, i motsetning til udekkede positive liposomer. Dekking med pektin kan derfor bli benyttet for å øke stabiliteten til positive liposomer. Den gode laggringsstabiliteten kan også sees på som et bevis for at en stor andel av liposomenes overflate ble dekket av pektin. Lagringsstabiliteten var avhengig av hvilken pektintype som ble benyttet til dekkingen. Amidert pektin desorberte trolig raskere fra liposomoverflaten enn de to andre pektintypene, siden produkter med denne pektintypen var minst stabile.

Studien har vist at både HM-, LM- og amidert pektin kan benyttes til produksjon av pektindekkede liposomer. Valg av pektintype kan gjøres på bakgrunn av ønskede egenskaper for de pektindekkede liposomene. Minst negativt zetapotensiale og høyest partikkelstørrelse oppnås ved å benytte HM-pektin. Mest negativt zetapotensiale og lavest partikkelstørrelse oppnås ved å benytte LM-pektin. Amidert pektin bindes muligens svakere til liposomene enn de to andre pektintypene, og er følgelig ikke like godt egnet.

Statistisk forsøksplanlegging ble benyttet for å undersøke prosess- og formuleringsfaktorer for produksjonen av pektindekkede liposomer. Undersøkelsene ble gjort med LM-pektin og kan ikke umiddelbart overføres til de andre pektintypene. Minst mulige partikkelstørrelser kan oppnås ved å dryppe liposomer til pektin, i motsetning til å dryppe pektin til liposomer, og ved å holde lipidkonsentrasjonen i liposomsuspensjonen lav. Pektinkonsentrasjonen kan også reduseres for å oppnå mindre partikkelstørrelser. Dette gjelder imidlertid kun ved pektinkonsentrasjoner

lavere enn den nødvendige konsentrasjonen for fullstendig metning av liposomoverflatene. Ved for lav pektinkonsentrasjon i forhold til lipidkonsentrasjon og mengde ladet lipid, vil imidlertid dekket andel av liposomoverflaten bli så lav at de pektindekkede liposomene flokkulerer. I denne studien var den mest ekstreme faktorkombinasjonen som ikke ga flokkulerte produkter, liposomer med 8,25 mM lipid og 4 mol% ladet lipid dekket med 0,0875 %(w/w) pektin.

Pektindekkede liposomer med mest mulig negativt zetapotensiale kan fremstilles ved å benytte liposomer med høy mengde ladet lipid og pektinløsninger med høy konsentrasjon. Det vil være tilstrekkelig å bruke høyt nivå på kun en av faktorene.

9. Kildeliste

- Alamelu, S. og Rao, K. P. (1991). "Studies on the carboxymethyl chitosan-containing liposomes for their stability and controlled release of dapsone." J Microencapsul **8**(4): 505-19.
- Anger, H. og Berth, G. (1984). "Gel permeation Chromatography and the Mark-Houwink Relation of Pectins with Different Degrees of Esterifications." Carbohydrate Polymers **6**: 193-202.
- Attwood, D. (2002). Disperse Systems. Pharmaceutics. The science of dosage forms and design. M. E. Aulton. Leicester, Churchill Livingstone: 71-100.
- Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R. og Moxham, B. J. (2002). Oral Anatomy, Embryology and Histology, Mosby.
- Boulmedarat, L., Piel, G., Bochot, A., Lesieur, S., Delattre, L. og Fattal, E. (2005). "Cyclodextrin-mediated drug release from liposomes dispersed within a bioadhesive gel." Pharm Res **22**(6): 962-71.
- Brookenhaven.Instruments.Ltd. (2009). "What is Zeta Potential? ." Hentet 25.03, 2009, fra <http://www.brookhaven.co.uk/zeta-potential.html>.
- Christensen, P. E. (1954). "Methods of grading pectin in relation to the molecular weight (intrinsic viscosity) of pectin." Food Res. **19**: 163–171.
- Claesson, P. M. og Ninham, B. W. (1992). "pH-dependent interactions between adsorbed chitosan layers." Langmuir **8**(5): 1406-1412.
- Crommelin, D. J. A. og Schreier, H. (1994). Liposomes. Colloidal Drug Delivery Systems. J. Kreuter, Marcel Dekker, Inc: 73-157.
- Demarger-Andre, S. og Domard, A. (1993). "Chitosan behaviours in a dispersion of undecylenic acid." Carbohydrate Polymers **22**: 117-126.
- Demarger-Andre, S. og Domard, A. (1994). "Chitosan behaviours in a dispersion of undecylenic acid. Structural parameters." Carbohydrate Polymers **24**: 177-184.
- Dong, C. og Rogers, J. A. (1991). "Polymer-coated liposomes: Stability and release of ASA from carboxymethyl chitin-coated liposomes." Journal of Controlled Release **17**: 217-224.
- Dong, C. og Rogers, J. A. (1992). "Poly(4-vinylpyridine)-coated liposomes: stability studies and release of acetylsalicylic acid." J Microencapsul **9**(4): 437-48.
- Dong, C. og Rogers, J. A. (1993). "Acacia-Gelatin Microencapsulated Liposomes: Preparation, Stability and Release of Acetylsalicylic Acid." Pharmaceutical Research **10**(1): 141-146.
- Elias, H.-G. (1997). Solution Thermodynamics. An introduction to polymere science. Weinheim, VCH verlagsgesellschaft 218-246.
- Encyclopedia Britannica. (2009). "Liposome." Hentet 25.03, 2009, fra <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/342910/liposome>.
- Erjavec, V., Pavlica, Z., Sentjurc, M. og Petelin, M. (2006). "In vivo study of liposomes as drug carriers to oral mucosa using EPR oximetry." International Journal of Pharmaceutics **307**: 1-8.

- Esbensen, K. H. (2006). Multivariate Data Analysis in Practice. Ålborg, Camo Software AS.
- Farshi, F. S., Özer, A. Y., Ercan, M. T. og A, H. A. (1996). "In-vivo studies in treatment of oral ulcers with liposomal dexamethasone sodium phosphate." Journal of Microencapsulation **13**(5): 537-544.
- Felleskatalogen. (2008). "A01A Munn- og tannmidler." Hentet 05.05, 2008, fra www.felleskatalogen.no.
- Felleskatalogen. (2009). "ATC-gruppe L01D Cytotoksiske antibiotika og lignende substanser " Hentet 31.03, 2009, fra www.felleskatalogen.no.
- Florence, A. T. og Attwood, D. (1998). Physicochemical principles of pharmacy. London, Pharmaceutical Press.
- Gandhi, R. B. og Robinson, J. R. (1994). "Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **13**: 43-74.
- Gregory, J. (1973). "Rates of Flocculation of Latex Particles by Cationic Polymers." Journal of Colloid and Interface Science **42**(2): 448-456.
- Guyot, D. (2006). Complex Experimental Design Problems. Multivariate Data Analysis in practice. K. H. Esbensen. Ålborg, Camo Software AS: 447-489.
- Guyot, D. (2006). Introduction to Experimental Design. Multivariate Data Analysis in Practice. K. H. Esbensen. Ålborg, Camo Software AS: 361-447.
- Guzey, D. og McClements, D. J. (2006). "Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry." Adv Colloid Interface Sci **128-130**: 227-48.
- Hagesaether, E. (2007). "Mucoadhesive hydrogel-kuler av kryssbundet pektin." Hentet 23.03, 2009, fra <http://www.farmatid.no/id/607>.
- Hagesaether, E., Bye, R. og Sande, S. A. (2008). "Ex vivo mucoadhesion of different zinc-pectinate hydrogel beads." Int J Pharm **347**(1-2): 9-15.
- Hagesaether, E. og Sande, S. A. (2007). "In vitro measurements of mucoadhesive properties of six types of pectin." Drug Dev Ind Pharm **33**(4): 417-25.
- Hagesaether, E. og Sande, S. A. (2008). "Effect of pectin type and plasticizer on in vitro mucoadhesion of free films." Pharm Dev Technol **13**(2): 105-14.
- Harris, D. og Robinson, J. R. (1992). "Drug Delivery via the Mucous Membranes of the Oral Cavity." Journal of pharmaceutical sciences **81**(1): 1-10.
- Harsanyi, B. B., Hilchie, J. C. og Mezei, M. (1986). "Liposomes as Drug Carriers for Oral Ulcers." Journal of dental research **65**(9): 1133-1141.
- Henriksen, I., Smistad, G. og Karlsen, J. (1994). "Interactions between liposomes and chitosan." International Journal of Pharmaceutics **101**: 227-236.
- Henriksen, I., Vågen, S. R., Sande, S. A., Smistad, G. og Karlsen, J. (1997). "Interactions between liposomes and chitosan II: effect of selected parameters on aggregation and leakage." International Journal of Pharmaceutics **146**: 193-204.
- Hillery, A. M. (2001). Drug Delivery: The Basic Concepts. Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. A. M. Hillery, A. W. Lloyd og J. Swarbrick. London, Taylor and Francis: 1-48.

- Hiorth, M., Tho, I. og Sande, S. A. (2003). "The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method." Eur J Pharm Biopharm **56**(2): 175-81.
- Hoogstraate, J., Benes, L., Burgaud, S., Horriere, F. og Seyler, I. (2001). Oral Trans-mucosal Drug Delivery. Drug Delivery and Targeting. A. M. Hillery, A. W. LLoyd og J. Swarbrick. London, Taylor and Francis: 146-206.
- Huggins, M. L. (1952). "The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules, IV. Dependence on Concentration." Journal of the American Chemical Society **64**: 276-2730.
- Jain, A. K., Kishore, B. C., Khar, R. K., Ahmed, F. J. og Diwan, P. V. (2007). "Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery." Journal of drug targeting **15**(6): 417-427.
- Karmali, P. P. og Chaudhuri, A. (2007). "Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises." Med Res Rev **27**(5): 696-722.
- Kato, A., Arakawa, M. og Kondo, T. (1984). "Preparation and stability of liposome-type artificial red blood cells stabilized with carboxymethylchitin." J Microencapsul **1**(2): 105-12.
- Kjønksen, A.-L., Hiorth, M., Roots, J. og Nyström, B. (2003). "Shear-Induced Association and Gelation of Aqueous Solutions of Pectin." Journal of Physical Chemistry B **107**: 6324-6328.
- Lasic, D. D. (1993). Liposomes: From Physics to Applications. Amsterdam, Elsevier Science B. V
- Lauten, R. A. (2004). Solution and interface characteristics of two water-soluble amphiphilic polymer systems. Department of Chemistry. OSLO, University of Oslo. **Philosophiae Doctor**: 53.
- Laye, C., McClements, D. J. og Weiss, J. (2008). "Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan." J Food Sci **73**(5): N7-15.
- Lehr, C. M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H. og Junginger, H. E. (1992). "In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers." International Journal of Pharmaceutics **78**: 43-48.
- Liu, G. M., Fu, L. og Zhang, G. Z. (2009). "Role of Hydrophobic Interactions in the Adsorption of Poly(ethylene glycol) Chains on Phospholipid Membranes Investigated with a Quartz Crystal Microbalance." Journal of Physical Chemistry B **113**(11): 3365-3369.
- Liu, L. S., Fishman, M. L., Hicks, K. B. og Kende, M. (2005). "Interaction of various pectin formulations with porcine colonic tissues." Biomaterials **26**: 5907-5916.
- Mabire, F., Audebert, R. og Quivoron, C. (1983). "Flocculation Properties of Some Water-Soluble Cationic Copolymers toward Silica Suspensions: A Semiquantitative Interpretation of the Role of Molecular Weight and Cationicity through a "Patchwork" Model." Journal of Colloid and Interface Science **97**(1): 120-136.
- Malvern Instruments Ltd. (2009). "Dynamic Light Scattering Instrumentation for classical 90 degree scattering measurements." Hentet 13.02, 2009, fra

- http://www.malvern.co.kr/LabKor/technology/dynamic_light_scattering/classical_90_degree_scattering.htm.
- MAN0149 Malvern Instruments Ltd. (2000). Zetasizer 1000HS/3000Hs. Making Size Measurements, Malvern Instruments Ltd.
- Mariott, C. (2002). Rheology. Pharmaceutics. The science of dosage form design. M. E. Aulton. London, Churchill Livingstone.
- McClements, D. J. (2005). "Theoretical Analysis of Factors Affecting the Formation and Stability of Multilayered Colloidal Dispersions." Langmuir **21**(21): 9777-9785.
- Mobed, M. og Chang, T. M. (1998). "Adsorption of chitin derivatives onto liposomes: optimization of adsorption conditions." J Microencapsul **15**(5): 595-607.
- Moore, D. og McCabe, G. P. (2003). Introduction to the practice of statistics. New York, W. H. Freeman and Company.
- Morfesis, A. (2008). "Particle Sizing by Dynamic Light Scattering." Hentet 13.02, 2009, fra http://www.brainshark.com/malvern/particlesize_DLS?pt=f2.
- Morfesis, A. (2008). "Zeta Potensial." Hentet 16.02., 2009, fra <http://www.brainshark.com/brainshark/vu/view.asp?pi=370327923>.
- Nafee, N. A., Ismail, F. A., Boraie, N. A. og Mortada, L. M. (2004). "Mucoadhesive Delivery Systems. I. Evaluation of Mucoadhesive Polymers for Buccal Tablet Formulation." Drug Development and Industrial Pharmacy **30**(9): 985-993.
- Rathbone, M. J., Drummond, B. K. og Tucker, I. G. (1993). "The oral cavity as a site for systemic drug delivery." Advanced Drug Delivery Reviews **13**: 1-22.
- Richard, P. og Hilditch, S. (2009). "D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance." Appl Microbiol Biotechnol **82**(4): 597-604.
- Rogers, J. A. og Anderson, K. E. (1998). "The Potential of Liposomes in Oral Drug Delivery." Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **15**(5): 421-480.
- Rolin, C. (1993). Pectin. Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives. R. L. Whistler og J. N. Bemiller. San Diego, Academic Press: 257-293.
- Romøren, K., Thu, B. J., Smistad, G. og Evennsen, Ø. (2002). "Immersion delivery of plasmid DNA. I. A study of the potential of liposomal delivery system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry." Journal of Controlled Release **85**: 203-213.
- Rykke, M. og Rølla, G. (1990). "Effect of silicone oil on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo." Scand J Dent Res **98**(5): 401-11.
- Rykke, M., Rølla, G. og Sønju, T. (1988). "Effect of pyrophosphate on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo." Scand J Dent Res **96**(6): 517-22.
- Rykke, M., Rølla, G. og Sønju, T. (1990). "Effect of sodium lauryl sulfate on protein adsorption to hydroxyapatite in vitro and on pellicle formation in vivo." Scand J Dent Res **98**(2): 135-43.
- Sakai, T. (1968). "Huggins Constant k' for flexible Chain Polymers." Journal of polymere science **6**: 1535-1549.

- Scheller, H. V. (2007). "Biosynthesis of Cell Wall Polysaccharides." Hentet 25.03, 2009, fra <http://www.uk.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>.
- Schmidgall, J. og Hensel, A. (2002). "Bioadhesive properties of polygalacturonides against colonic epithelial membranes." *Int J Biol Macromol* **30**(5): 217-25.
- Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. (2002). The chemical structure of pectins. *Pectins and their Manipulations*. G. B. Seymour og J. P. Knox. Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 1-25.
- Sehgal, S. og Rogers, J. A. (1995). "Polymer-coated liposomes: improved liposome stability and release of cytosine arabinoside (Ara-C)." *J Microencapsul* **12**(1): 37-47.
- Simberg, D., Hirsch-Lerner, D., Nissim, R. og Barenholz, Y. (2000). "Comparison of Different Commercially Available Cationic Lipid-Based Transfection Kits." *Journal of Liposome Research* **10**(1): 1-13.
- Smart, J. D. (2004). "Recent Developments in the Use of Bioadhesive Systems for Delivery of Drugs to the Oral Cavity." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **21**(4): 319-344.
- Smart, J. D. (2005). "The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion." *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 1556-1568.
- Smart, J. D., Kellaway, I. W. og Worthington, H. E. C. (1984). "An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **36**: 295-299.
- Smistad, G., Jacobsen, J. og Sande, S. A. (2007). "Multivariate toxicity screening of liposomal formulations on a human buccal cell line." *International Journal of Pharmaceutics* **330**: 14-22.
- Sriamornsak, P., Thirawong, N., Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Thongborisute, J. og Takeuchi, H. (2007). "Atomic force microscopy imaging of novel self-assembling pectin-liposome nanocomplexes." *Carbohydrate Polymers* **71**: 324-329.
- Storm, G. og Crommelin, D. J. A. (1998). "Liposomes: Quo vadis." *Pharmaceutical Science and Technology Today* **1**(1): 19-31.
- Sudhakar, Y., Kuotsu, K. og Bandyopadhyay, A. K. (2006). "Buccal bioadhesive drug delivery -A promising option for orally less efficient drugs." *Journal of Controlled Release* **114**: 15-40.
- Sunamoto, J. og Iwamoto, K. (1986). "Protein-coated and polysaccharide-coated liposomes as drug carriers." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **2**(2): 117-136.
- Szoka, F., Jacobson, K., Derzko, Z. og Papahadjopoulos, D. (1980). "Fluorescence studies on the mechanism of liposome-cell interactions in vitro." *Biochim Biophys Acta* **600**(1): 1-18.
- Takeada, C., Takahashi, Y., Seto, I., Kawano, G. og Takayama, K. (2007). "Influence of Pectins on Preparation Characteristics of Lactoferrin." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **55**(8): 1164-1168.
- Takeuchi, H., Matsui, Y., Sugihara, H., Yamamoto, H. og Kawashima, Y. (2005). "Effectiveness of submicron-sized, chitosan-coated liposomes in oral

- administartion of peptide drugs." International Journal of Pharmaceutics **303**: 160-170.
- Takeuchi, H., Matsui, Y., Yamamoto, H. og Kawashima, Y. (2003). "Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their efectiveness in the oral administration of calcitonin in rats." Journal of Controlled Release **86**: 235-242.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T., Hino, T. og Kawashima, Y. (1994). "Mucoadhesion of polymer-coated liposomes to rat intestine in vitro." Chem Pharm Bull (Tokyo) **42**(9): 1954-6.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Toyoda, T., Hidekazu, T., Hino, T. og Kawashima, Y. (1998). "Physical stability of size controlled small unilameller liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol." International Journal of Pharmaceutics **164**: 103-111.
- Takeuchi, H., Yamamoto, H., Toyoda, T., Toyobuku, H., Hino, T. og Kawashima, Y. (1998). "Physical stability of size controlled small unilameller liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol." International Journal of Pharmaceutics **164**(1-2): 103-111.
- Thakur, B. R., Singh, R. K. og Handa, A. K. (1997). "Chemistry and Uses of Pectin - A Review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **37**(1): 47-73.
- The MathWorks (2009). "Statistics Toolbox." Hentet 25.03, 2009, fra <http://www.mathworks.com/access/helpdesk/help/toolbox/stats/f56635.html>.
- Thelin, B., Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L. og Carlson, R. (1996). Försöksplanering och optimering för experimentalisten. Anvendelse av kjemometri innen forskning og industri. R. Nortvedt, F. Brakstad, O. M. Kvalheim og T. Lundstedt, Tidsskriftforlaget Kjemi AS: 81-106.
- Thirawong, N., Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S. og Sriamornsak, P. (2007). "Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **67**: 132-140.
- Thirawong, N., Thongborisute, J., Takeuchi, H. og Sriamornsak, P. (2008). "Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes." Journal of Controlled Release **125**: 236-245.
- Tidsskriftet. (2006). "Tema Munnhulen." Hentet 20.03, 2009, fra http://www.tidsskriftet.no/index.php?seks_id=1378826.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V. og Renard, C. M. G. C. (1995). Pectins. Food Polysaccharides and their applications. A. M. Stephen, G. O. Phillips og P. A. Williams. Boca Raton, FL Taylor & Francis: 287-323.
- Wang, Q. og Cui, S. W. (2005). Understanding the Physical Properties of Food Polysaccharides. Food Charbohydrates. Chemistry, Physical Properties and Applications. S. W. Cui. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 162-214.
- Yamada, H. og Kiyohara, H. (2007). Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structure. Cell Glycobiology and Developement Helath and

- Disease in Glycomedicine. J. P. Kamerling, Y. C. Lee, a. Suzuki, N. Taniuchi og A. G. J. Voragen. Oxford, Elsevier Ltd. **4**: 664-688.
- Yang, X. og Robinson, J. R. (1998). Bioadhesion in Mucosal Drug Delivery. Biorelated polymers and gels - Controlled release and Applications in Biomedical engeneering: 135-184.
- Zuidam, N. J., Vrueth, R. og Crommelin, D. J. A. (2003). Characterization of liposomes. Liposomes. Practical approach. V. P. Torchilin og V. Weissig. Oxford, Oxford University Press: 31-77.
- Zuidam, N. J., Winden, E., Vrueth, R. og Crommelin, D. J. A. (2003). Stability, storage and sterilization of liposomes. Liposomes. Practical approach. V. P. Torchilin og V. Weissig. Oxford, Oxford University Press: 149-165.

10. Vedlegg

VEDLEGG 1: Zetapotensiale og partikkelstørrelse for alle pektinløsninger og pektindekkede liposomer undersøkt under verifiseringen av dekkningen.

VEDLEGG 2: Fullfaktorforsøk, 2^3 -design. Oversikt over positive liposomer, pektin og designprøver. Plott fra modelleringen.

VEDLEGG 3: Redusert faktorforsøk, 2^{4-1} -design. Oversikt over positive liposomer, pektin og designprøver. Plott fra modelleringene.

VEDLEGG 4: Optimalisering, central composite design. Oversikt over positive liposomer, pektin og designprøver. Plott fra modelleringene.

VEDLEGG 5: Stabilitetsstudie: Grafer over zetapotensialene etter 12 uker.

VEDLEGG 1: Verifisering av dekkingen

Pektinløsningene er oppgitt i %w/w. Liposomene benyttet i forsøkene var DPPC med 10% DPTAP (positive) eller DPPG (negative), 3mM.

Zetapotensiale:

Fortynning:	Zetapotensiale					
	Ufortynnet		200-400 µl:3 ml		30 µl: 3ml	
	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width	Zeta (mV)	Width
<i>LM-pektin</i>						
LM-pektin 0,2 %	-41,2	3,9	-23,2	29,4		
Positive liposomer dekket med 0,2 % LM-pektin			-46,9	1,6		
Negative liposomer dekket med 0,2 % LM-pektin			-37,7	28,8	-14,7	13,9**
LM-pektin 0,05%			-4,8	8,3	2,2	1,6
Positive liposomer dekket med 0,05 % LM-pektin			-44,3	1,6		
<i>Amidert pektin</i>						
Amidert pektin 0,2 %			-43,5	1,6	-35,6	37,4
Positive liposomer dekket med 0,2 % amidert pektin			-39,6	1,6	-42,5	16,8*
Negative liposomer dekket med 0,2 % amidert pektin			-41,6	21,4	-32,8	33,5**
Amidert pektin 0,05 %	-49,3	1,8	-24,9	36,7	-5,8	4,8
Amidert pektin 0,005 %	-47,2	17,1				
Positive liposomer dekket med amidert pektin 0,005 %			-40,5	1,8		
<i>HM-pektin</i>						
HM-pektin 0,2 %			-27,2	1,6	-23,2	28,2
Positive liposomer dekket med HM-pektin 0,2 %			-27	1,6	-27	4,3*
Negative liposomer dekket med HM-pektin 0,2 %			-30,4	17	-25	31,3**
HM-pektin 0,05 %	-30,6	1,8	-28,9	24,8		
Positive liposomer dekket med HM-pektin 0,05 %			-29,2	1,8		
HM-pektin 0,005 %	-29,3	23,4				
Positive liposomer dekket med HM-pektin 0,005 %			-23,3	1,8		

* Kun én topp eller én dominerende samling av topper. **Mange spredte topper

Partikkelstørrelse:

Fortynning:	Partikkelstørrelse					
	Ufortynnet			Fortynnet**		
	Str. (nm)	PI	Count (KCps)	Str. (nm)	PI	Count (KCps)
<i>Pektinløsninger</i>						
LM-pektin 0,05 %	293	1	20,7	>1000*	1	<10
LM-pektin 0,2 %	520	0,912	66,9			
Amidert pektin 0,005 %	501	0,877	44,5			
Amidert pektin 0,05 %	557	0,77	379,2	500-1000 *	1	<10
Amidert pektin 0,2 %	949	0,863	345	>1000 *	1	10-30
HM-pektin 0,005 %	675	1	41,9			
HM-pektin 0,05 %	557	0,77	379,2	500-1000 *	1	<10
HM-pektin 0,2 %	636	0,885	Ikke notert	>1000 *	1	10-30
<i>Pektindekkede liposomer</i>						
Liposomer med 0,05 %						
LM pektin				205	0,22	323,2
Liposomer med 0,2 %						Ikke
LM pektin				297	0,3	notert
Liposomer med 0,005%						
amidert pektin				359	0,31	232,2
Liposomer med 0,2 %						
amidert pektin				269	0,4	432,6
Liposomer med						
HM-pektin 0,005 %				934	0,91	477
Liposomer med 0,05 %						
HM-pektin				317	0,5	473
Liposomer med 0,2 %						
HM-pektin				397	0,66	446,7

*Målingene må avbrytes underveis på grunn av for lav count rate. **Dekkede liposomer ble målt ved fortynning 125 µl: 2 ml. Pektinløsningene ble målt ved fortynning 25 µl: 2 ml buffer.

VEDLEGG 2: Fullfaktorforsøk, 2³-design

I tabellene følger oversikt over partikkelstørrelse (str), PI ved størrelsesmåling, turbiditet og zetapotensiale for utgangsliposomer og pektinløsninger. For designprøvene oppgis i tillegg størrelsesendringen ved dekking.

Positive liposomer og pektin:

Preparat	Størrelse			
	Str. (nm)	PI	Turbiditet	Zeta (mV)
Liposomer (DPPC/DPTAP)	166	0,12	0,277	26,5
Liposomer (Egg-PC/DOTAP)	184	0,167	0,155	25,1
LM-pektin 1 % (w/w)*	248	0,946	0,007	-41

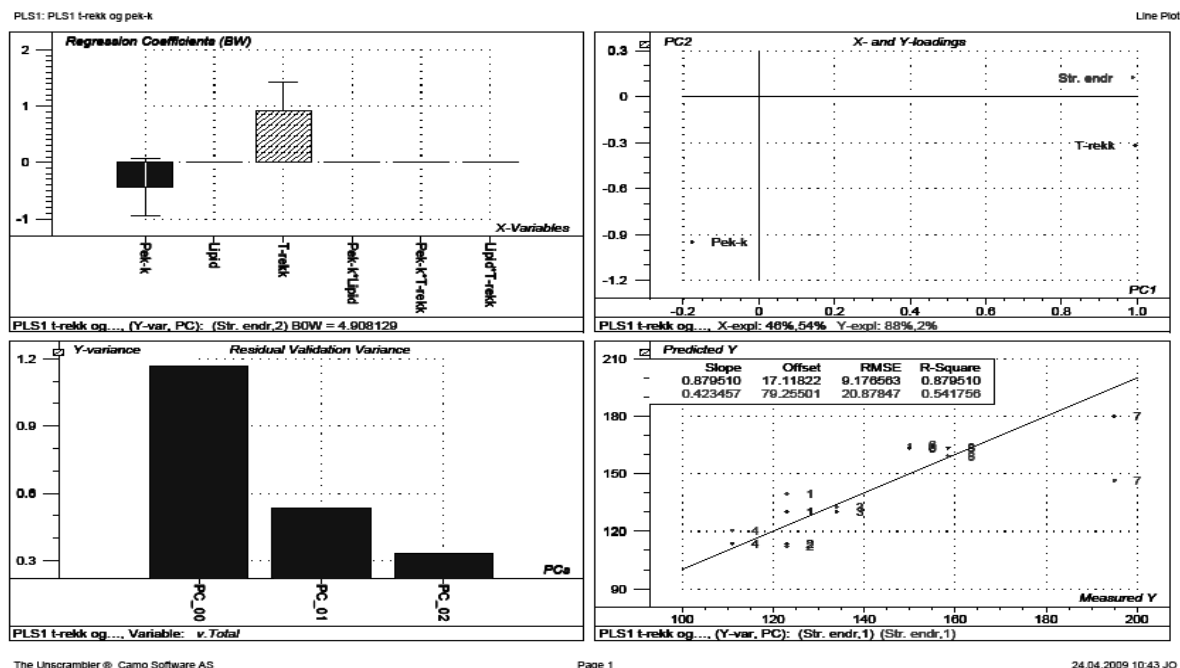
*Målt ved fortykning 200 µl prøve : 3 ml buffer

Designprøver:

Design-prøver	Behandlingskombinasjon			Størrelse				
	Pek-k (w/w%)	Lipid	T-rekk	Str. (nm)	PI	Str. endr (nm)	Zeta (mV)	Turbiditet
1	0,2	Gel	Lip → pek	289	0,263	123	-46,9	0,133
2	1	Gel	Lip → pek	289	0,367	123	-46,9	0,193
3	0,2	Flytende	Lip → pek	319	0,29	134	-47,9	0,106
4	1	Flytende	Lip → pek	295	0,258	111	-47,2	0,165
5	0,2	Gel	Pek → lip	452	0,548	286	-44,2	0,289
6	1	Gel	Pek → lip	316	0,472	150	-47	0,238
7	0,2	Flytende	Pek → lip	379	0,304	195	-46,9	0,164
8	1	Flytende	Pek → lip	343	0,484	158	-47,2	0,279

Nedenfor følger modelleringene fra fullfaktorforsøket.

PLS-1 modell for størrelsesendringen (str. endr.):



Forklaringer til modelleringen:

Plottene som ble vist var plott for vektete regresjonskoeffisienter, ladninger, residual Y-varianse og predikert mot målt Y-verdi vises.

Tabellen viser oversikt over faktorene i forsøket.

Faktor	Forkortelse	Nivåer
Pektinkosentrasjonen (w/w%)	Pek-k	0,2 og 1
Fasetilstand av liposomsuspensjonen	Lipid	Gelfase og flytende fase
Tilsetningsrekkefølge	T-rekk	Lip→pek og pek→lip

VEDLEGG 3: Redusert faktorforsøk, 2^{4-1} -design

I tabellene følger oversikt over partikkelstørrelse (str), PI ved størrelsesmåling og zetapotensiale for positive liposomer, designprøver og pektinløsninger. For designprøvene oppgis i tillegg størrelsesendringen ved dekking. Anvendte liposomer var DPPC med DPTAP.

Positive liposomer og pektinløsninger:

Preparat	Størrelse		Zeta (mV)
	Str. (nm)	PI	
<i>Liposomer</i>			
Liposomer 2% ladning, 3mM	123	0,147	9,8
Liposomer 10% ladning, 3mM	151	0,15	30,8
Liposome 2% ladning, 10mM	124	0,169	11
Liposomer 10% ladning, 10mM	121	0,134	30
Liposomer 6% ladning, 6.5 mM	149	0,119	26,3
<i>Pektinløsninger</i>			
LM-pektin 0,2 %	520	0,912	-38,6
LM-pektin 0125 %	445	1	-47,1
LM-pektin 0.05%	282	0.816	-41.2

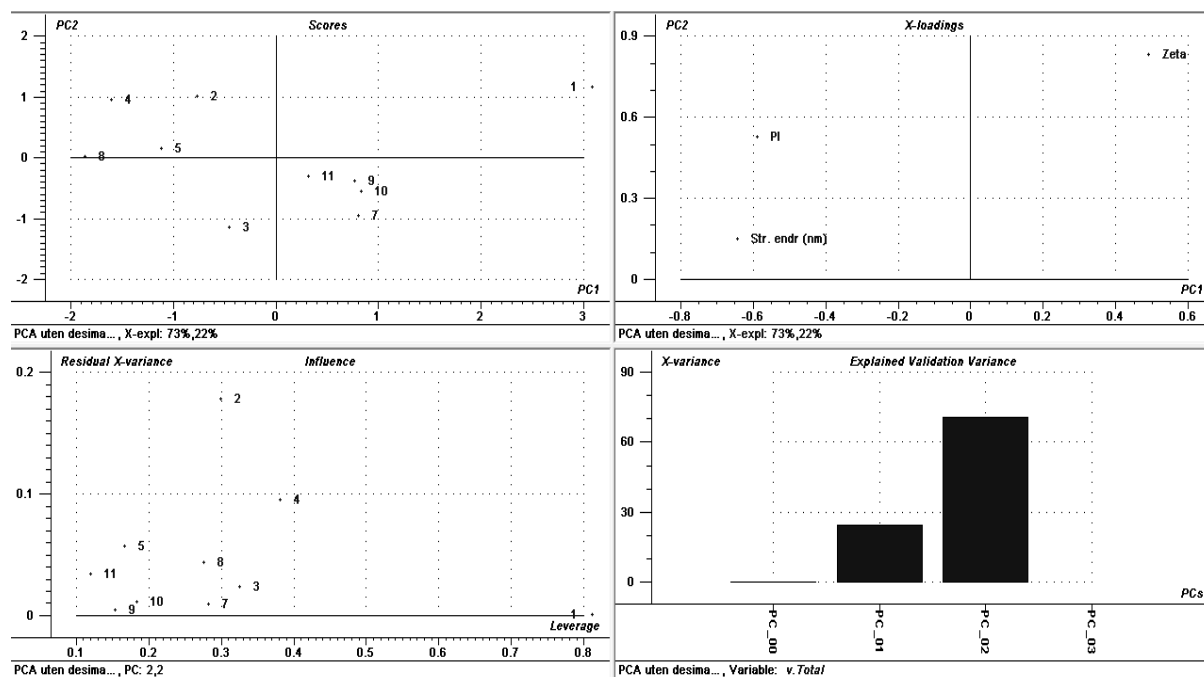
*Målt ufortynnet

Designprøver:

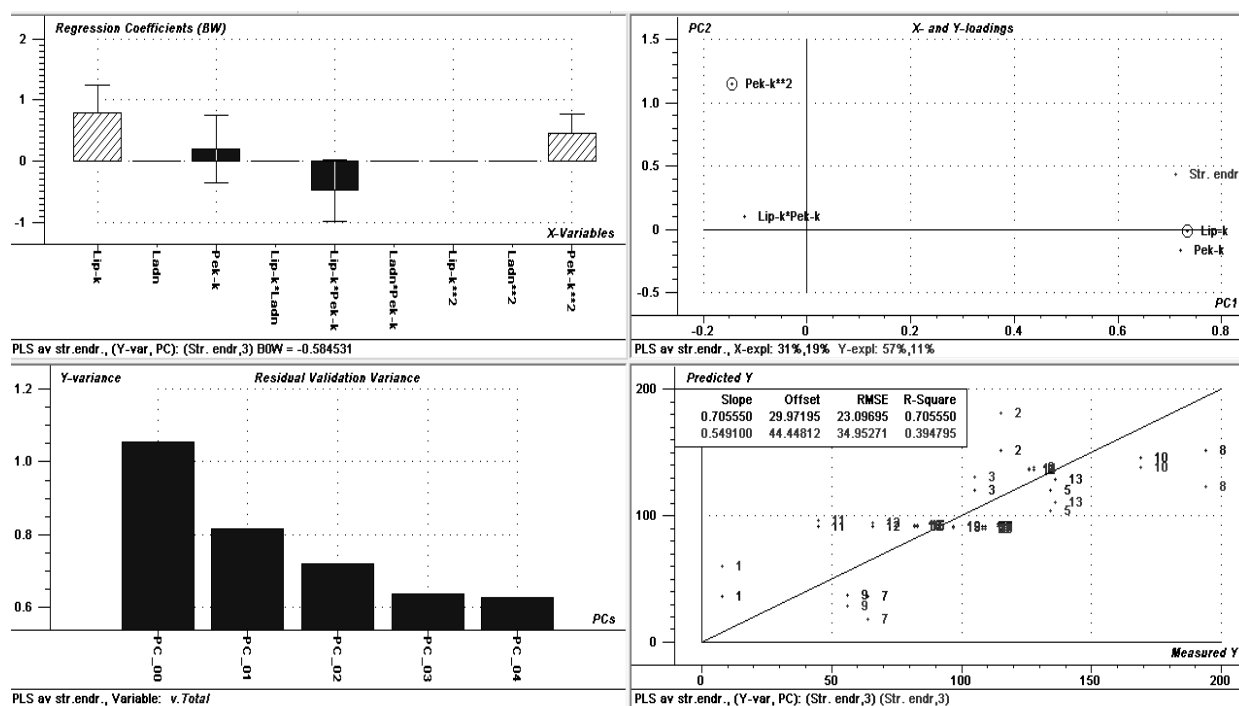
Designprøver	Behandlingskombinasjon				Størrelse		Str. endr (nm)	Zeta (mV)
	Lip-k (mM)	Str. (nm)	PI	Pek-k (w/w%)	Str. (nm)	PI		
1a	3	2	7	0,05	131	0,175	8	-34,5
2a	10	2	7	0,2	239	0,456	115	-42,5
3a	3	10	7	0,2	256	0,287	105	-48
4a	10	10	7	0,05	322	0,423	200	-43
5a	3	2	38	0,2	258	0,409	134	-45,4
6a	10	2	38	0,05	632	0,529	508	-29,6
7a	3	10	38	0,05	215	0,213	64	-45,1
8a	10	10	38	0,2	315	0,398	194	-46,4
cent-1	6,5	6	22,5	0,125	232	0,229	83	-43,2
cent-2	6,5	6	22,5	0,125	232	0,211	82	-43,5
cent-3	6,5	6	22,5	0,125	257	0,248	109	-43,6

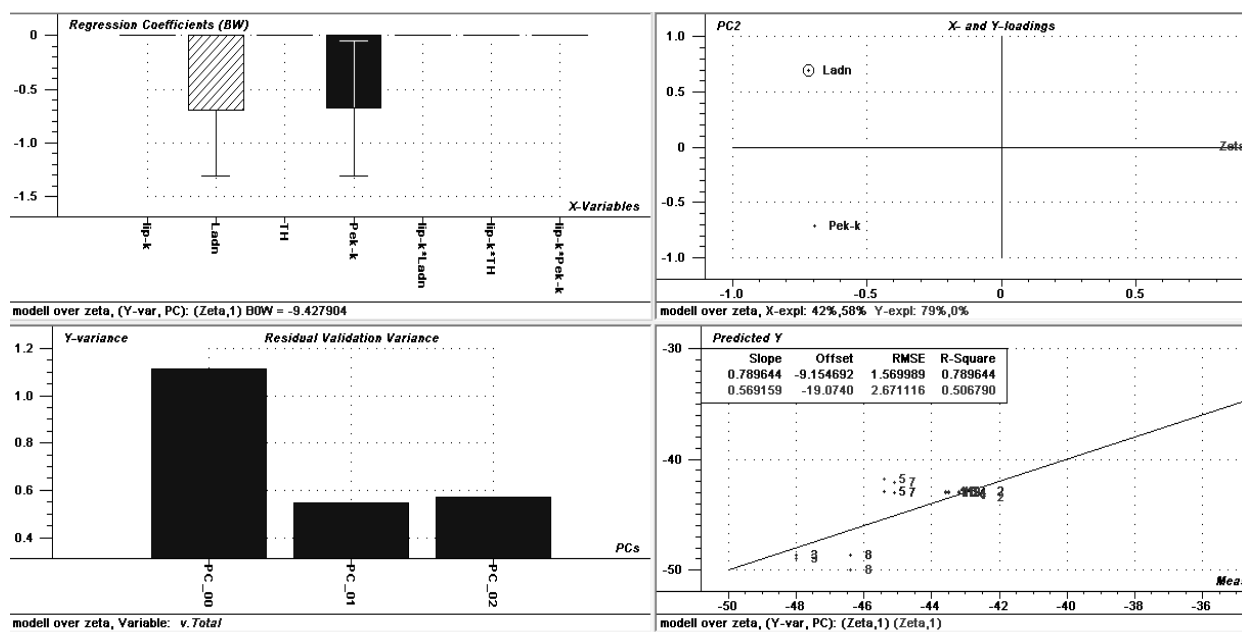
Nedefor følger modelleringene for det reduserte faktorforsøket

PCA-modell for responsene:



PLS-1 modell for størrelsesendringen (str. endr.):



PLS-1 modell for zetapotensialet (zeta):**Forklaringer til modelleringen:**

Responsene som ble undersøkt var størrelsesendring (Str. endr), polydispersitetsindeks ved størrelsesmåling (PI) og zetapotensiale (Zeta). Plottene som ble vist ved PLS-1 analysene var plott for vektete reggresjonskoeffisienter, ladninger, residual Y-varianse og predikert mot målt Y-verdi.

Plottene som ble vist ved PCA var ladningsplott, scoreplott, influenceplott og plottet over forklart Y-varians.

Tabellen viser oversikt over faktorene i forsøket.

Faktor	Forkortelse	Nivå	
Lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonen (mmol/L)	Lip-k	3	10
Mengde ladet lipid (mol%)	Ladn	2	10
Tilsetningshastighet av liposomer til pektinløsningen (rpm)	TH	7	38
Pektinkonsentrasjon (%w/w)	Pek-k	0,05	0,2

VEDLEGG 4: Optimalisering, central composite design

I tabellen følger oversikt over partikkelstørrelse (str), størrelsesendring, PI ved størrelsesmåling, zetapotensiale og pH for positive designprøver i optimaliseringsdesignet

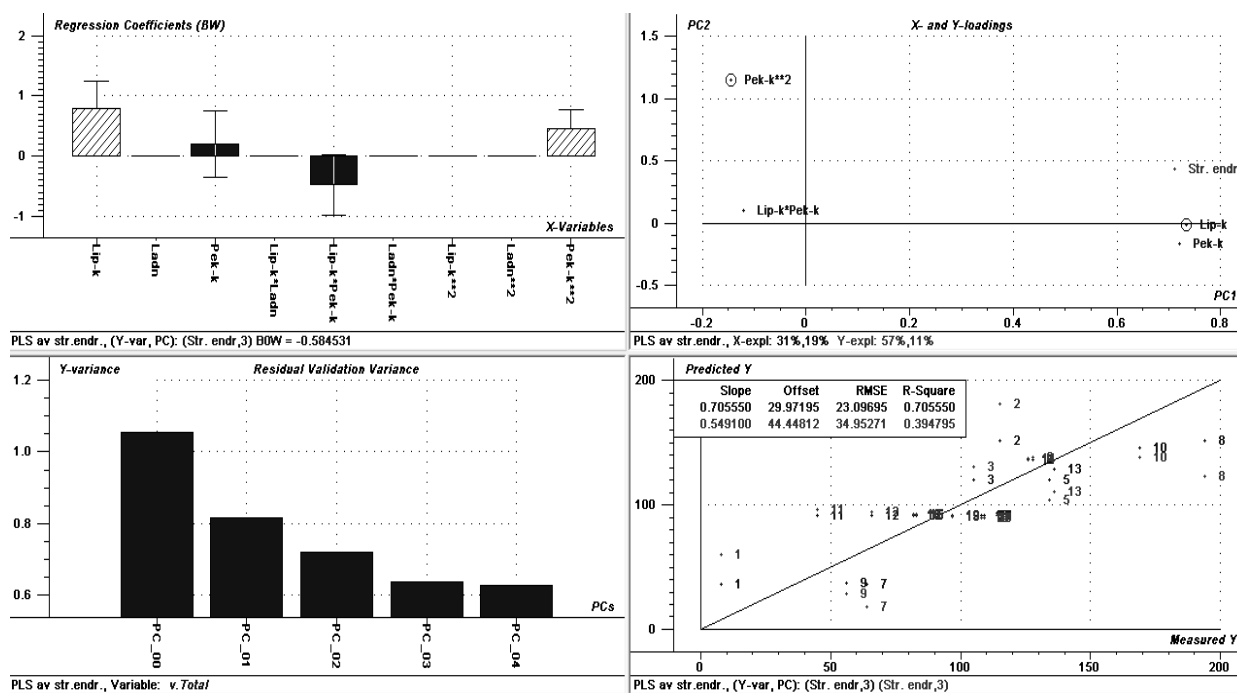
<i>Design prøver</i>	Behandlingskombinasjon				Responsvariabler			
	Lip-k (mM)	Ladn (mol%)	Pek-k (w/w%)	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)	Str.endr (nm)	pH
1a	3	2	0,05	131	0,175	-34,5	8	Ikke målt
2a	10	2	0,2	239	0,456	-42,5	115	Ikke målt
3a	3	10	0,2	256	0,287	-48	105	Ikke målt
4a	10	10	0,05	322	0,423	-43	200	Ikke målt
5a	3	2	0,2	258	0,409	-45,4	134	Ikke målt
6a-ny	8,25	4	0,0875	296	0,235	-40,4	127	6,4
7a	3	10	0,05	215	0,213	-45,1	64	Ikke målt
8a	10	10	0,2	315	0,398	-46,4	194	Ikke målt
*1	3	6	0,125	223	0,226	-43,7	56	6,1
*2	10	6	0,125	301	0,34	-43,2	169	5,8
*3	6,5	2	0,125	201	0,287	-38,7	45	6,1
*4	6,5	10	0,125	236	0,2	-45	66	5,9
*5	6,5	6	0,05	285	0,157	-41,6	136	6,6
*6	6,5	6	0,2	276	0,305	-46,4	126	4,5
ref-1	6,5	6	0,125	232	0,229	-43,2	83	Ikke målt
ref-2	6,5	6	0,125	232	0,211	-43,5	82	Ikke målt
ref-3	6,5	6	0,125	257	0,248	-43,6	109	Ikke målt
cent-1	6,5	6	0,125	257	0,229	-44,1	108	5,9
cent-2	6,5	6	0,125	249	0,216	-44,7	97	5,9
cent-3	6,5	6	0,125	258	0,237	-44,7	109	5,7

I tabellen følger oversikt over partikkelstørrelse (str), PI ved størrelsesmåling og zetapotensiale for positive liposomer og pektinløsninger benyttet i optimaliseringsdesignet. For pektinløsninger oppgis også pH.

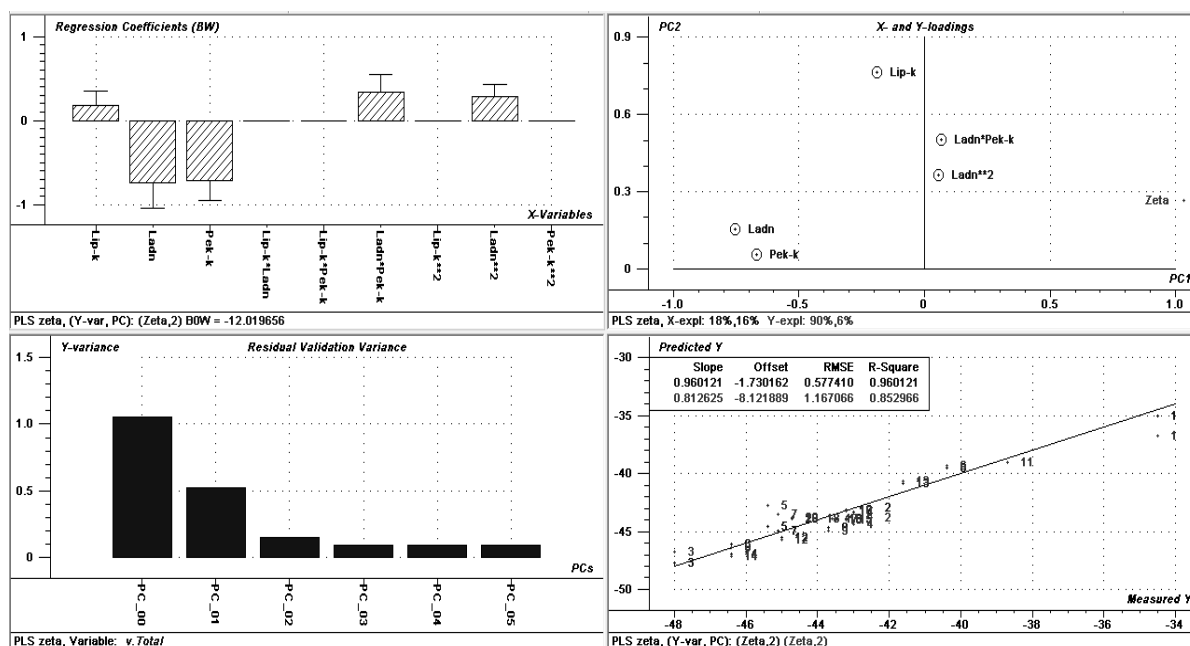
	Størrelse			
Preparat	Str. (nm)	PI	Zeta (mV)	pH
Liposomer				
Liposomer 2% ladning, 6,5mM	170	0,114	31,2	
Liposomer 10% ladning, 6,5mM	156	0,178	13,6	
Liposomer 4% ladning, 8,25mM	169	0,129	22,8	
Liposomer 6% ladning, 10mM	132	0,147	24,7	
Liposomer 6% ladning, 6,5mM	149	0,157	23	
Liposomer 6% ladning, 3mM	162	0,105	27,1	
Pektinløsninger*				
LM-pektin 0,2 %	604	1	-38,9	4
LM-pektin 0,125 %	460	1	-45,7	5,1
LM-pektin 0,0875%	296	1	-38,9	6,3
LM-pektin 0,05%	297	0,939	Ikke målt	6,6

*Målt ufortynnet

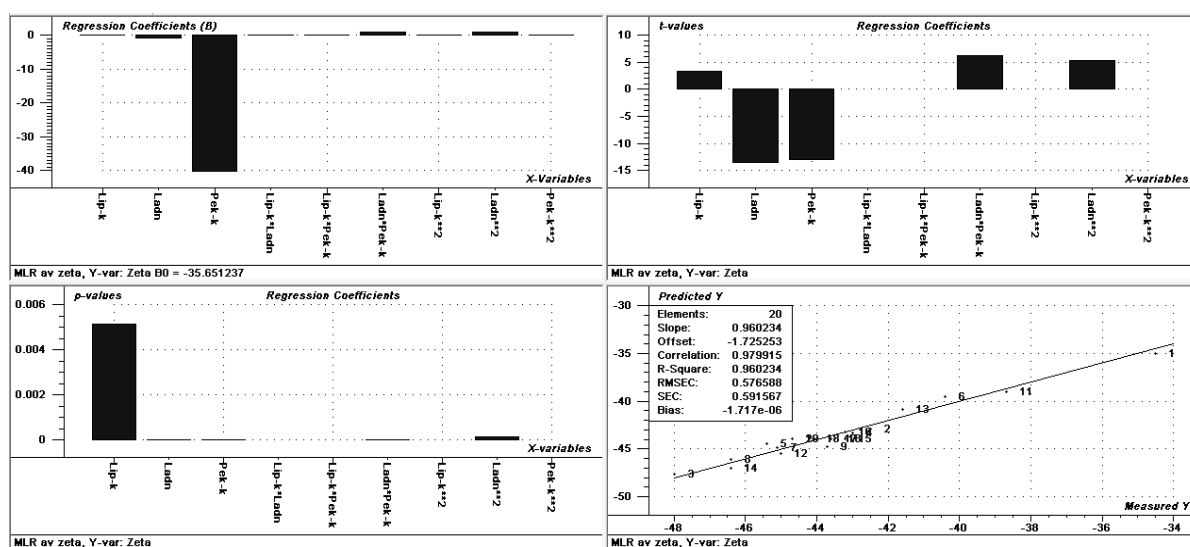
PLS-1 modell for størrelsesendringen (str. endr.):



PLS-1 modell for zetapotensialet (zeta):



MLR-modell for zetapotensiale (zeta):



Forklaringer til modelleringen

Responsene som ble undersøkt var størrelsesendring og zetapotensiale. Plottene som ble vist ved PLS-1 analysene var plott for vektete reggresjonskoeffisienter, ladninger, residual Y-varianse og predikert mot målt Y-verdi. Plottene som ble vist fra MLR-analysen var regresjonskoeffisienter, t- og p-verdier for regresjonskoeffisientene og predikert mot målt Y-verdi.

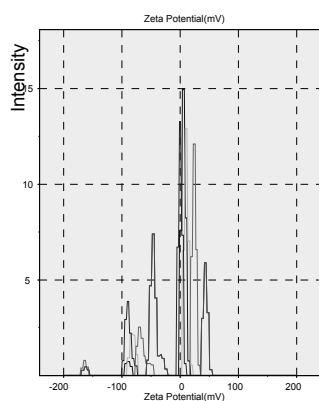
Tabellen viser en oversikt over faktorene som ble undersøkt i forsøket.

Faktor	Forkortelse	Nivå		
Lipidkonsentrasjon i liposomsuspensjonen (mmol/L)	Lip-k	3	6,5	10
Mengde ladet lipid (mol%)	Ladn	2	6	10
Pektinkonsentrasjon (%w/w)	Pek-k	0,05	0,125	0,2

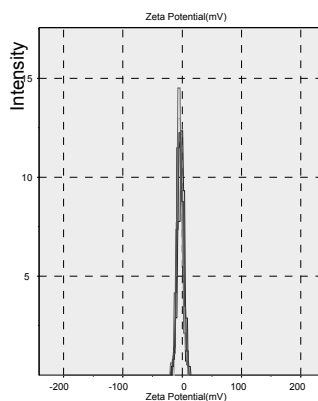
VEDLEGG 5: Stabilitetsstudie

Nedenfor følger grafene fra zetapotensialemålinger av pektinløsninger og pektindekkede liposomer etter lagring i 12 uker.

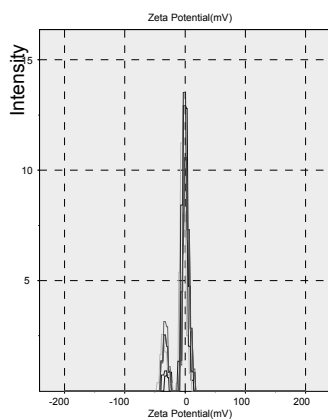
LM-pektin 0,05 % (w/w):



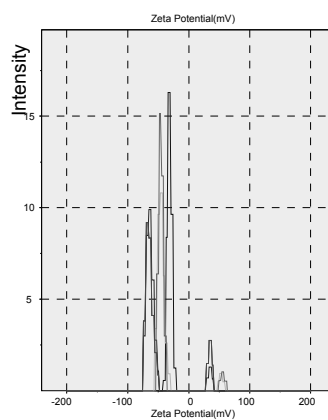
LM-pektin 0,125 % (w/w):



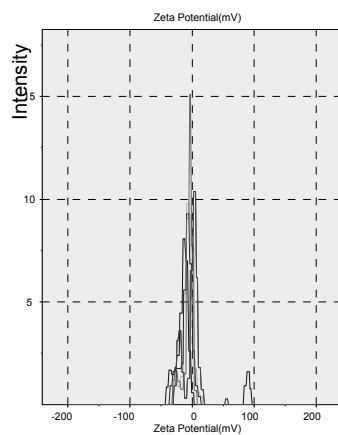
Amidert-pektin 0,05 % (w/w):



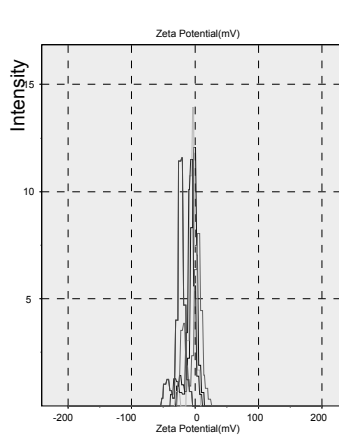
Amidert pektin 0,125 % (w/w):



HM-pektin 0,05 % (w/w):

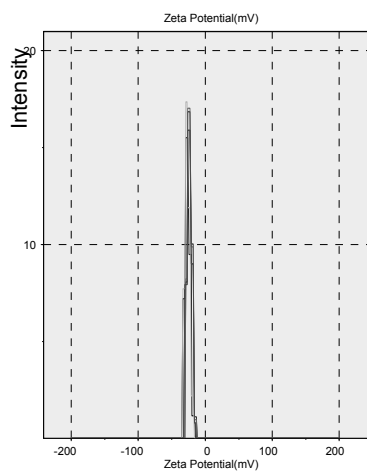


HM-pektin 0,125 % (w/w):

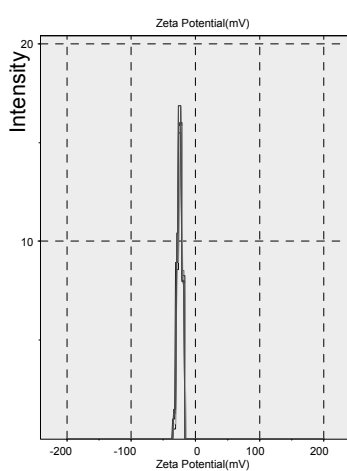


Pektindekkede liposomer: Pektintype-formulering

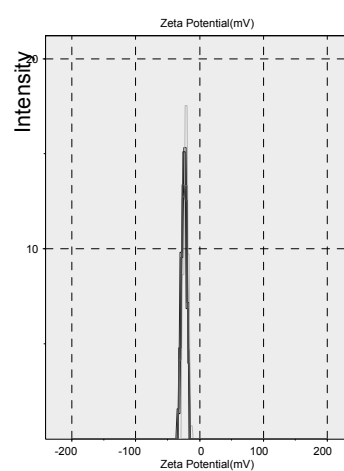
HM-1 a:



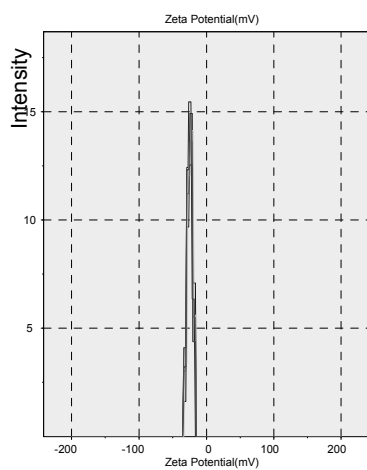
HM-1 b:



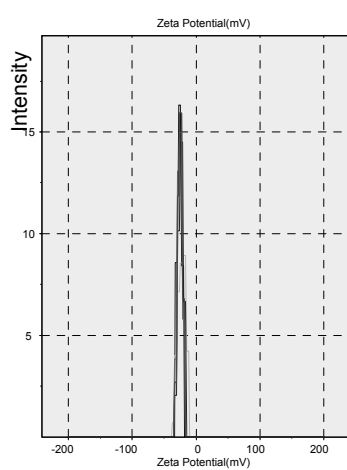
HM-1 c:



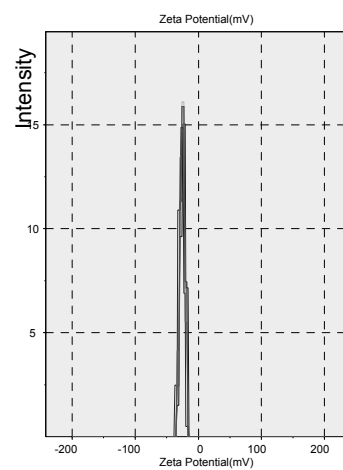
HM-2 a:



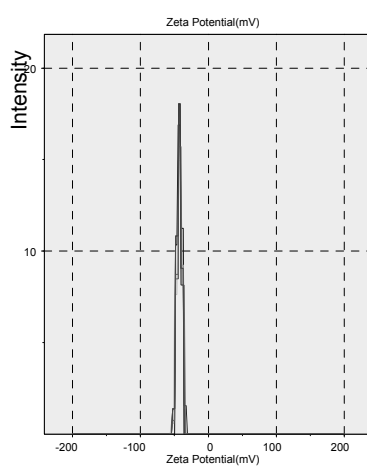
HM-2 b:



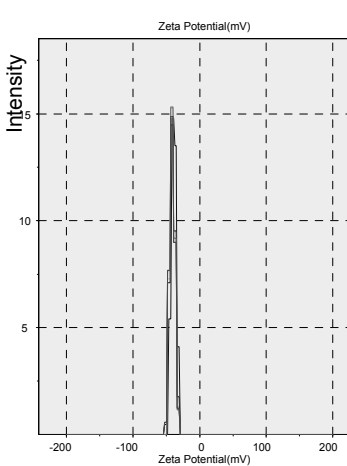
HM 2c:



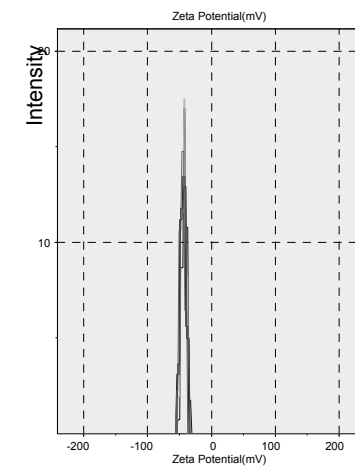
LM-1 a:



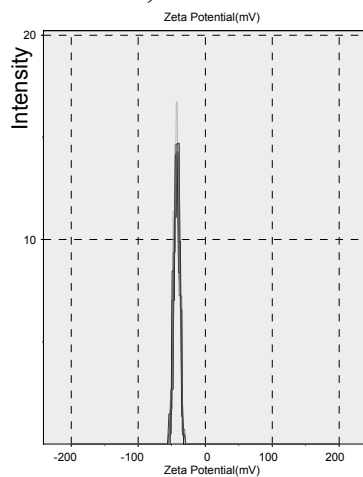
LM-1 b:



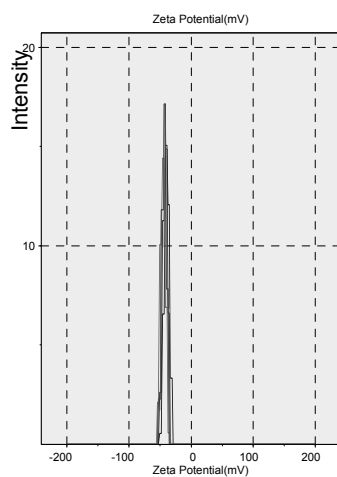
LM-1 c:



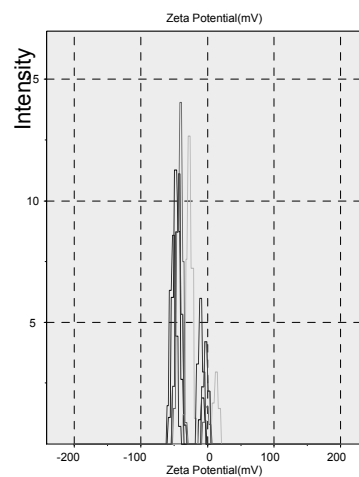
LM-2 a;



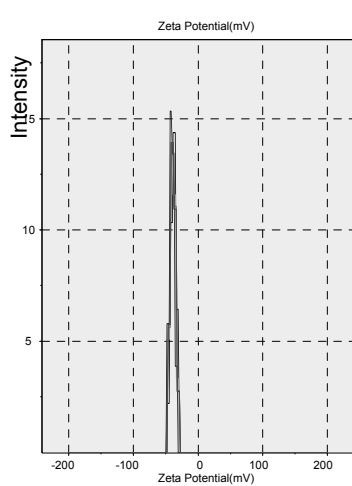
LM-2 b:



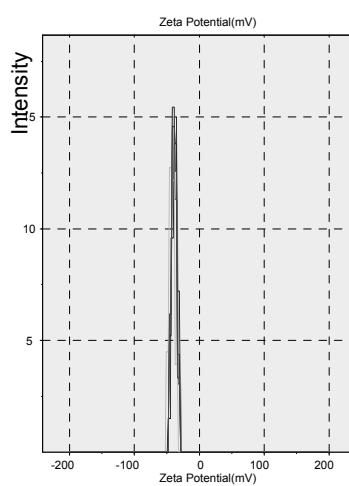
LM-2 c:



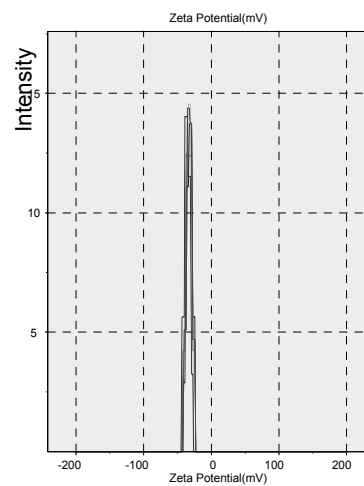
Amidert-1 a:



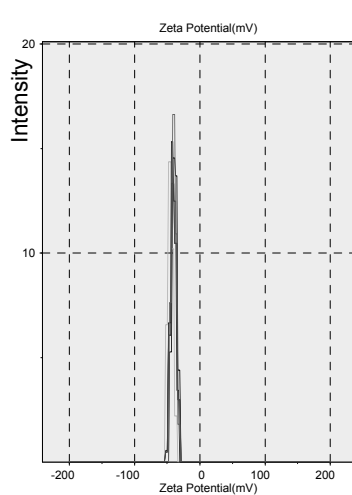
Amidert-1 b:



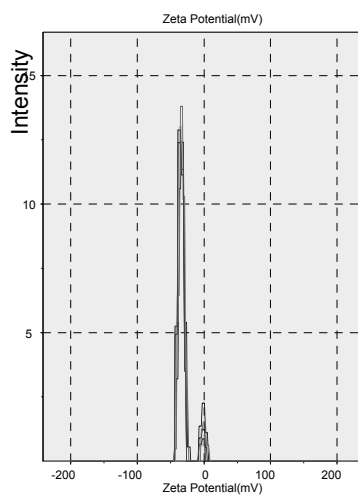
Amidert-1 c:



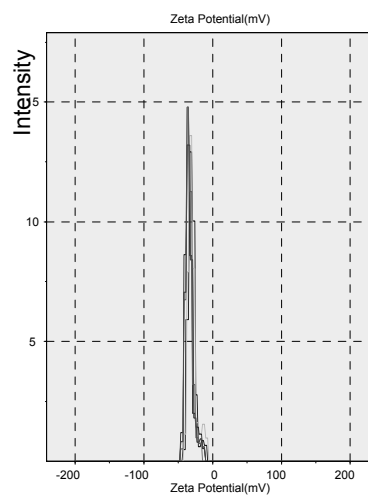
Amidert-2 a:



Amidert-2 b:



Amidert-2 c:



Forklaringer til grafene fra stabilitetsstudien:

Formulering 1 og 2 varierte med henhold til lipidkonsentrasjon og pektinkonsentrasjon ved produksjon, slik tabellen under viser.

Formuleringsfaktor	Formulering 1	Formulering 2
Lipidkonsentrasjon (mM)	10	3
Pektinkonsentrasjon (w/w %)	0,125	0,05

Pektinløsningene ble målt ved samme fortynning før måling som de pektindekkede liposomene, slik tabellen under viser.

Prøver	Fortynning ved måling
HM-pektin 0,05 %(w/w) og HM-2	150 µl prøve : 2,5 ml buffer
HM-pektin 0,125 %(w/w) og HM-1	60 µl prøve : 3 ml buffer
LM-pektin 0,05 %(w/w) og LM-2	200 µl prøve : 2 ml buffer
LM-pektin 0,125 %(w/w) og LM-1	60 µl prøve : 3 ml buffer
Amidert-pektin 0,05 %(w/w) og amidert-2	150 µl prøve : 2,5 ml buffer
Amidert-pektin 0,125 %(w/w) og amidert-1	60 µl prøve : 3 ml buffer